

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



* 5 3 0 9 5 5 9 4 5 5 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

CLONACION DEL GEN *pyr-4* DE
CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM Y SU
USO EN UN VECTOR DE
TRANSFORMACION.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel A. Peñalva Soto'.

Vº Bº. El Director
Miguel A. Peñalva Soto

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alejandro Vian'.

El Doctorando

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRO VIAN HERRERO

1.993

AGRADECIMIENTOS

A Antibióticos, S.A., por haberme permitido empezar una Tesis doctoral en su Departamento de Investigación, y a todos los que allí fueron mis compañeros y compañeras. Es injusto no citar a todos, pero más arbitrario es no mencionar expresamente a los Dres. Enrique Arribas, Luis Boto, José M^a Buesa y Jesús Cantoral, de quienes he recibido amables consejos y ayuda desinteresada. Un recuerdo especial para Margarita Martínez y el Dr. Daniel Penas.

A Miguel Angel Peñalva, director de esta Tesis, por haber estado a la altura de las circunstancias cuando la situación humana así lo ha requerido. Y a Eduardo Espeso, Beatriz Pérez-Esteban y la Dra. Margarita Orejas, por lo mucho que me han apoyado en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC para concluir este trabajo. También al Dr. Gonzalo Gómez Alarcón y a Juana Lorenzo, de la misma institución, por dejarme un hueco en su laboratorio.

A los catedráticos D. César Nombela y D. José Martínez-Peinado, por su labor de tutoría en las Facultades de Farmacia y Biología, respectivamente.

A todos ellos y a otras muchas personas cuyos nombres harían una lista larga, y de los que creo que tendré su comprensión y disculpa por no aparecer en esta hoja, quiero ofrecerles el esfuerzo empleado en este trabajo.

ABREVIATURAS

A:	Adenina
ATCC:	American Type Culture Collection
C:	Citosina
cpm:	Cuentas por minuto
DNA:	Acido desoxirribonucléico
DNasa:	Desoxirribonucleasa
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Acido etilén-diamino-tetracético
FOA:	Acido 5-fluororótico
G:	Guanina
kb:	1.000 pares de bases
kDa:	1.000 dalton
NG:	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
OMPdecase:	Orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa
p/v:	Relación peso-volumen
pb:	Par de bases
PEG:	Polietilén-glicol
RNA:	Acido ribonucléico
RNasa:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato sódico
T:	Timina
TE:	Tris-EDTA
Tris:	Tris-hidroximetil-aminometano
ufc:	Unidad formadora de colonia
UV:	Ultravioleta
v/v:	Relación volumen-volumen

Los aminoácidos se abrevian según el código de una letra recomendado por la IUB-IUPAC.

INDICE

I. INTRODUCCION.	1
1. CEFALOSPORINAS.	1
2. <i>CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM</i>	4
3. TRANSFORMACION DE HONGOS FILAMENTOSOS.	7
A. Generalidades.	7
B. Metodología.	13
C. Aplicaciones.	15
4. TECNICAS DE DNA RECOMBINANTE EN LA FABRICACION DE ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS.	20
5. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.	30
II. MATERIALES Y METODOS.	35
1. MATERIALES.	35
A. Cepas.	35
B. Vectores y derivados.	36
C. Medios de cultivo.	37
D. Soluciones y tampones.	40
E. Productos radiactivos.	41
F. Otros.	41
2. METODOS.	42
A. Manipulación de <i>E. coli</i> y técnicas de DNA recombinante.	42
B. Manipulación de <i>C. acremonium</i>	45
C. Programas informáticos.	53
III. RESULTADOS.	55
1. CLONACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE <i>C. ACREMONIUM</i> QUE CODIFICA PARA LA OROTIDINA 5'-FOSFATO DESCARBOXILASA.	55
A. Hibridación heteróloga del DNA genómico.	55
B. Sondeo de una genoteca.	55
C. Subclonación y mapeo.	57
D. Complementación de la mutación <i>pyrF</i> de <i>E. coli</i>	58
E. Presencia y tamaño del producto que codifica el DNA clonado.	62

INDICE

2. SECUENCIA DEL GEN CLONADO Y LAS ZONAS FLANQUEANTES.	63
A. Gen estructural.	65
B. Promotor.	67
C. Terminador.	69
3. COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS.	70
A. Alineamiento.	70
B. Arbol filogenético.	79
4. AISLAMIENTO DE MUTANTES AUXOTROFOS.	80
5. SENSIBILIDAD A FLEOMICINA.	83
6. CONSTRUCCION DE UN VECTOR DE TRANSFORMACION PARA SELECCIONAR POR RESISTENCIA A FLEOMICINA.	83
7. OBTENCION DE PROTOPLASTOS.	86
8. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS Y SELECCION POR RESISTENCIA A FLEOMICINA.	89
9. ESTABILIDAD DE LOS TRANSFORMANTES.	93
10. ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES.	95
 IV. DISCUSION.	 101
1. CLONACION DEL GEN <i>pyr-4</i> DE <i>C. ACREMONIUM</i>	101
2. COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS.	108
3. TRANSFORMACION DE <i>C. ACREMONIUM</i>	110
A. Ausencia de mutantes <i>pyr-4</i>	110
B. Transformación por resistencia a fleomicina.	115
C. Comparación del procedimiento desarrollado con otros sistemas de transformación de <i>C. acremonium</i>	119
D. Mejoras futuras.	124
E. Posibilidades del sistema desarrollado.	126
 V. CONCLUSIONES.	 133
 VI. BIBLIOGRAFIA.	 135

I. INTRODUCCION

1. CEFALOSPORINAS.

El descubrimiento de las cefalosporinas se debe a Giuseppe Brotzu (Fig. 1), en la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia). Brotzu trabajó con la hipótesis de que en la autodepuración del agua debían existir microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de gérmenes patógenos. En 1945 aisló un hongo de aguas residuales que identificó como *Cephalosporium acremonium*. Estableció que producía un antibiótico nuevo, activo frente a varias bacterias gram-positivas y gram-negativas. Con filtrados impuros de cultivo líquido realizó pruebas clínicas con éxito en infecciones experimentales. En 1948 publicó su trabajo en una revista sin proyección internacional, haciendo constar el deseo de que su labor continuase en centros mejor dotados [51]. Su hallazgo posiblemente hubiera quedado olvidado sin la intervención de Blyth Brook, quien durante la 2ª Guerra Mundial había sido oficial de Salud Pública en Cerdeña. Brook dio cuenta de aquellos resultados al equipo que había purificado la penicilina en la Universidad de Oxford (Ernst Chain, Howard Florey y Edward Abraham, entre otros). Brotzu envió la cepa a Inglaterra y años más tarde, en 1955, se estableció la estructura del antibiótico β -lactámico cefalosporina C. Para tener una perspectiva histórica, pueden consultarse las referencias 88 y 250.

Las cefalosporinas están constituidas por un anillo β -lactámico, que caracteriza a todos los antibióticos de este tipo; y un anillo de dihidrotiazina, en lugar de tiazolidina, que las distingue de las penicilinas (Fig. 2). La cefalosporina C tiene poco poder antibiótico y por vía química se transforma en ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), punto de partida de toda una serie de cefalosporinas semisintéticas. La diferencia entre las cefalosporinas se debe a los grupos sustituyentes de los carbonos 3 y 7 [revisado en 52 y 166].

Desde el punto de vista económico, las cefalosporinas son



Fig. 1.- Retrato de Giuseppe Brotzu (1895-1976). Reproducido de la referencia 88.

CEFALOSPORINAS

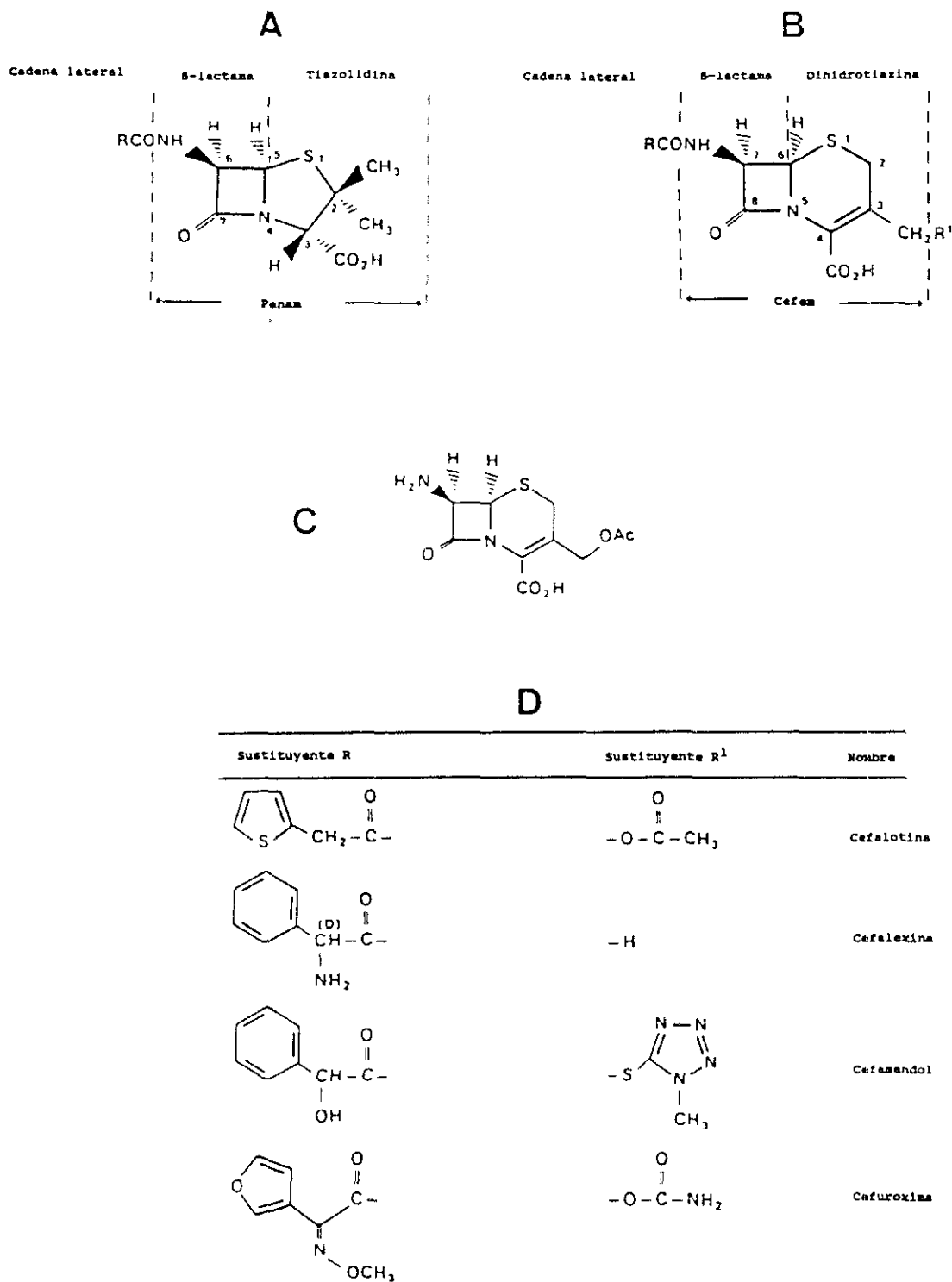


Fig. 2.- Nomenclatura y numeración del esqueleto de penicilinas (A) y cefalosporinas (B). La fórmula C corresponde al 7-ACA. En D se muestran ejemplos de cefalosporinas semisintéticas derivadas del 7-ACA con importancia clínica. Tomado de la referencia 59.

el grupo más importante de antibióticos. La producción mundial estimada en 1990 de cefalosporina C fue de 2.300 Tm, equivalentes a 1.150 Tm de 7-ACA. El valor de las especialidades, obtenidas en gran parte a partir de 7-ACA, fue del orden de medio billón de pesetas [25].

Las cefalosporinas -como las penicilinas- interfieren en la formación de la pared celular bacteriana, uniéndose a proteínas denominadas PBPs que están implicadas en la síntesis de peptidoglicano. Para ello tienen que atravesar la membrana externa y el periplasma. Hay tres mecanismos de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos: menor permeabilidad, mutaciones en las PBPs o ruptura enzimática por β -lactamasas [281, 383]. Las cefalosporinas son resistentes a algunos tipos de β -lactamasas a las que las penicilinas son sensibles [166, 263, 343].

Las indicaciones clínicas de las cefalosporinas son generalmente las mismas que las de las penicilinas. Las cefalosporinas suelen usarse como tratamiento de segunda elección, en parte debido a su precio y en parte para no aumentar de modo incontrolado las resistencias que se crean en los gérmenes patógenos. Tienen toxicidad baja y cuando aparece alergia a penicilinas, también hay reacción frente a cefalosporinas en un 5-10% de los casos [216, 250].

2. *CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM*.

C. acremonium (= *Acremonium chrysogenum* = *A. strictum* [286]) es un hongo filamentoso que se usa para la producción industrial de cefalosporina C [276]. Está clasificado dentro de los hongos imperfectos (*Fungi imperfecti*) por carecer de reproducción sexual [286]. Sin embargo, utilizando filogenias basadas en la secuencia del RNA ribosómico 5S, se le sitúa como un ascomiceto y dentro del subgrupo de los pirenomicetos, estrechamente relacionado con

Neurospora crassa [77, 174].

El ciclo de vida en cultivo sumergido consta del desarrollo inicial de hifas septadas con células mononucleadas y haploides. A continuación, las hifas se hinchan y fragmentan para producir artrosporas, o desarrollan conidióforos muy simples que dan lugar a conidiosporas. La germinación de ambos tipos de esporas vuelve a producir hifas [271, 275].

A pesar de la importancia clínica y económica de las cefalosporinas, los estudios estrictamente genéticos de *C. acremonium* son escasos, debido a la ausencia de ciclo sexual y a la baja eficacia del ciclo parasexual. La frecuencia de recombinación mitótica se puede aumentar mediante fusión de protoplastos (cfr. también el apartado 4). De este modo se ha elaborado un mapa de *C. acremonium* con 8 grupos de ligamiento en el que se han situado 15 loci [295].

La ruta de biosíntesis de cefalosporina C se conoce con detalle (Fig. 3). Se elucidó mediante incorporación de compuestos marcados radiactivamente, análisis de mutantes bloqueados y síntesis en extractos libres de células [192]. Los primeros pasos hasta isopenicilina N son comunes a penicilinas y cefalosporinas. En *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans* se produce penicilina G ó V -dependiendo del precursor que se añade al medio de cultivo para que se incorpore a la cadena lateral- a partir de isopenicilina N, paso catalizado por la acil-CoA:isopenicilina N acil-transferasa (gen *penDE*). En actinomicetos y otros procariotas se produce cefamicina C a partir de desacetil-cefalosporina C en varios pasos [revisado en 1 y 254]. La biosíntesis de cefalosporina está regulada por la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre [276, 282] y existe un conocimiento considerable de las enzimas que intervienen en la ruta [254].

En la actualidad están clonados y secuenciados todos los genes estructurales de *C. acremonium* directamente implicados en la síntesis de cefalosporina C (Fig. 3) salvo *cefD* (isopenicilina N epimerasa). Estos son: *pcbAB* (tripéptido sintetasa) [156]; *pcbC*

INTRODUCCION

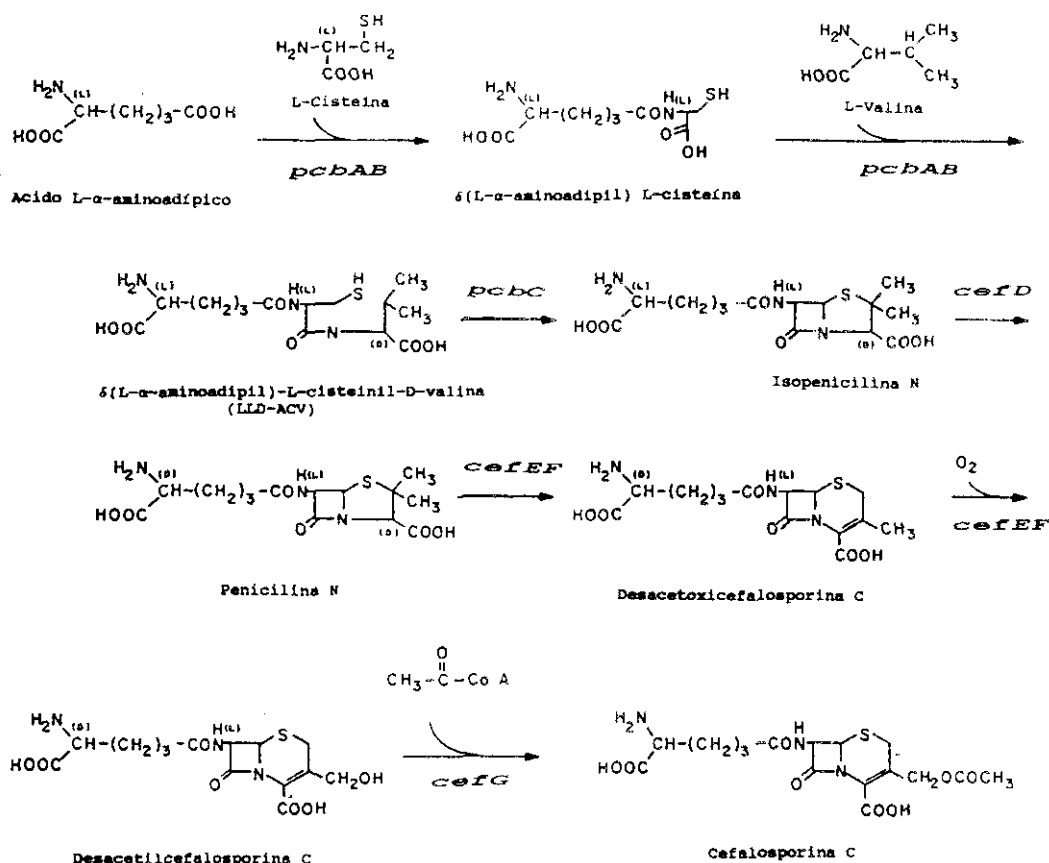


Fig. 3.- Síntesis de cefalosporina C en *C. acremonium*. Se indican los nombres de los genes de cada paso, de acuerdo con la nomenclatura normalizada propuesta por Ingolia y Queener [180]. Modificado a partir de la referencia 99.

(isopenicilina N sintetasa, o ciclasa) [337]; *cefEF* (penicilina N expandasa/desacetoxi-cefalosporina C hidroxilasa) [339]; y *cefG* (desacetil-cefalosporina C acetil-transferasa) [157, 255].

El cariotipo molecular de *C. acremonium* consta de 8 cromosomas que oscilan entre 1.700 y 4.000 kb, y el tamaño total del genoma se estima en 22.500 kb [358]. Los trabajos citados en el párrafo anterior permiten situar a los genes *pcbAB* y *pcbC* juntos y en el cromosoma VI, y a los genes *cefEF* y *cefG*, juntos y en el cromosoma II. En ambas agrupaciones la transcripción de los dos genes es divergente.

Además de los genes mencionados, están clonados el gen *LEU2*

(isopropil-malato deshidrogenasa) [122] y el gen *niaD* (nitrato reductasa) [412]. Están clonados y secuenciados el gen *alp* (proteasa alcalina) [184], el gen *pyr-4* (orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa) [399, 400; y este trabajo] y genes ribosómicos [68, 77, 188, 189]. Está clonado y parcialmente secuenciado el gen de la actina [C. Patiño y M. A. Peñalva, comunicación personal]. El DNA mitocondrial tiene un longitud de 26,7 kb [269] y se han secuenciado distintas partes del mismo, como la subunidad I de la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria [301] o distintos fragmentos que confieren replicación autónoma en levadura [182, 284, 302, 355, 387]. Se han detectado elementos extracromosómicos semejantes a plásmidos [269] y a virus [93].

De los sistemas que existen para la transformación genética de esta especie se tratará en el apartado 5 de la Introducción y en el apartado 3.C de la Discusión.

3. TRANSFORMACION DE HONGOS FILAMENTOSOS.

La transformación de hongos filamentosos se basa en la de *S. cerevisiae*. La transformación de levadura y sus posibilidades están ampliamente revisadas en las referencias 47, 154, 280 y 416, entre otras. La transformación de hongos filamentosos se ha revisado en repetidas ocasiones, refiriéndose sobre todo a *A. nidulans* o a *N. crassa*, especies de las que se tiene mayor conocimiento genético y fisiológico. Pueden consultarse las referencias 23, 90, 118, 141, 322 y 382, entre otras.

3.A. Generalidades.

Transformación es la introducción artificial de DNA dentro de una célula para producir un cambio heredable. Es el nexo de unión entre el análisis *in vitro* del DNA y su función *in vivo*. Como se verá en el apartado 4, el disponer de un sistema eficaz

para introducir genes en una cepa es un paso imprescindible para su mejora por medio de ingeniería genética.

La captura y expresión de DNA exógeno por las células fúngicas es un fenómeno que ocurre con una frecuencia muy baja, del orden de 1/100 ó 1/1.000 en el mejor de los casos. Para poder distinguir las células que han incorporado el DNA de las que no lo han hecho, es necesario que por lo menos parte del DNA transformante confiera un fenotipo seleccionable (detectable). Tal fragmento de DNA se denomina marcador. Se llama cotransformación a la introducción simultánea de dos moléculas distintas de DNA en una misma célula. En este caso, una de las moléculas lleva el marcador, mientras que la otra confiere una característica que no siempre se puede seleccionar directamente, aunque se puede detectar más tarde en los cotransformantes.

Los vectores que se utilizan para transformar hongos filamentosos tienen como mínimo el marcador fúngico unido a un plásmido de *E. coli* y cortes únicos de restricción para poder introducir otros genes. El origen de replicación y el marcador del plásmido procariota sirven fundamentalmente para disponer de gran cantidad de vector por amplificación en *E. coli*.

Los marcadores pueden ser de dos tipos principales, según la forma con la que se seleccionan los transformantes: de auxotrofía y de resistencia. Los sistemas que emplean marcadores de auxotrofía se basan en complementar con el alelo silvestre una mutación previamente establecida en la cepa receptora. Es frecuente que la mutación sea en genes de la ruta de síntesis de un aminoácido o una base nitrogenada. Por tanto, la selección de los transformantes se hace en medio mínimo, ya que sólo las células que han captado y expresan el marcador pueden crecer en él (Fig. 4A). Tienen la ventaja de que el marcador puede ser homólogo o, en muchos casos, de alguna especie filogenéticamente próxima. Son ejemplos de estos sistemas el basado en la complementación con el gen homólogo *trpC* en *P. chrysogenum* [342] o el basado en la complementación de un mutante *pyrG* de *A. nidulans* con el gen equivalente *pyr-4* de *N. crassa* [20]. En ge-

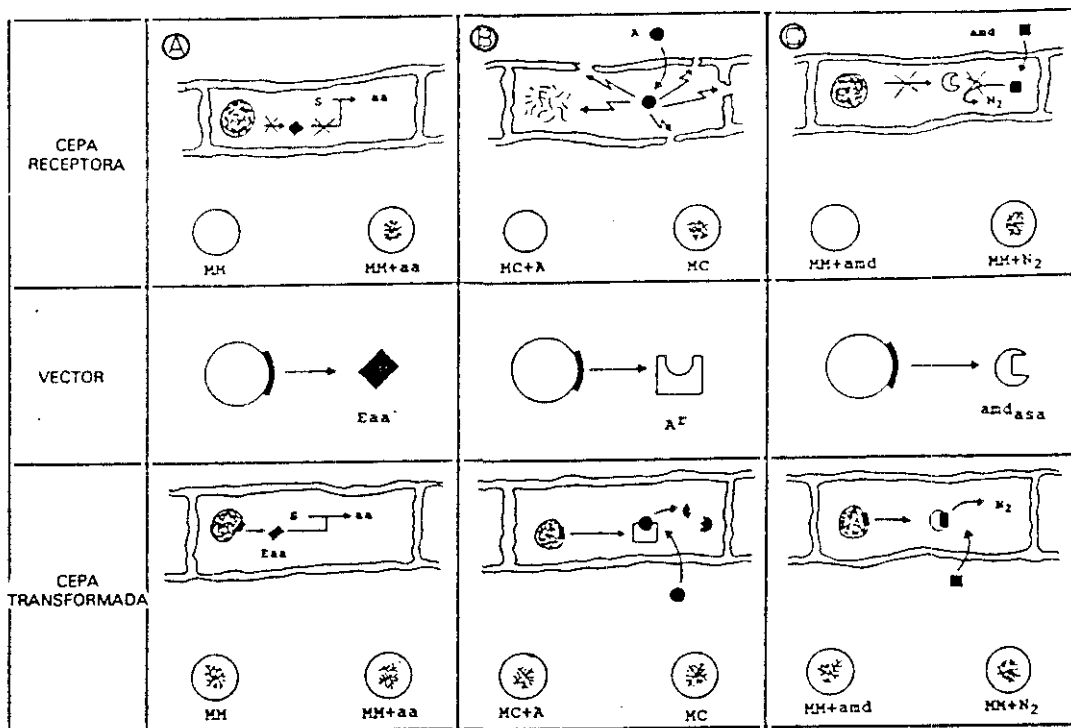


Fig. 4.- Selección de transformantes según el tipo de marcador. A) Complementación de auxotrofia. B) Resistencia a drogas. C) Uso de acetamida.

Abreviaturas: A = inhibidor; A⁺ = enzima de resistencia; aa = aminoácido, base nitrogenada o vitamina; amd = acetamida; amd_{asa} = acetamidasa; Eaa = enzima; MC = medio completo; MM = medio mínimo; S = sustrato.

Tomado de la referencia 141.

neral, con los sistemas de complementación de auxotrofia se obtiene una frecuencia de transformación por encima de 50 transformantes/ μ g de vector o superiores. Presentan el inconveniente de tener que mutagenizar la cepa receptora ya que, además de la auxotrofia buscada, se pueden producir otras mutaciones con efecto negativo sobre la biosíntesis del producto de interés industrial. Por otra parte, la obtención de auxótrofos no siempre es factible en especies o estirpes poco estudiadas, como en el caso de las cepas industriales [322]. El aislamiento de mutantes auxótrofos puede mejorarse con procedimientos como

la filtración [117]. En ocasiones se pueden seleccionar directamente estirpes que portan mutaciones con determinados compuestos. Un ejemplo es el uso del ácido 5-fluororótico para la selección positiva de cepas con mutaciones que causan la pérdida de función del gen estructural que codifica para la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa [41].

Los marcadores de resistencia permiten seleccionar los transformantes en un medio con una droga a la que la cepa es sensible (Fig. 4B). Suelen emplear un gen procariota que inactiva la droga, por lo que la frecuencia de transformación resultante es baja (0,1-1 transformante/ μ g de DNA). Cuando el gen de resistencia se pone bajo el control de un promotor fúngico adecuado, la frecuencia aumenta, aunque en general no supera los 20 transformantes/ μ g de DNA. Son ejemplos de estos sistemas los basados en la selección por resistencia a los aminoglucósidos G418 [300] o higromicina B [315, 357] para transformar *C. acremonium*. La ventaja que presentan los sistemas de transformación y selección por resistencia es que se pueden usar directamente en las cepas industriales sin necesidad de introducir más mutaciones.

En ocasiones el gen de resistencia es de origen fúngico. Tal es el caso de los marcadores que confieren resistencia a oligomicina [407] o a benomilo [287], que son variantes alélicas de genes que insensibilizan frente a la droga usada en la selección.

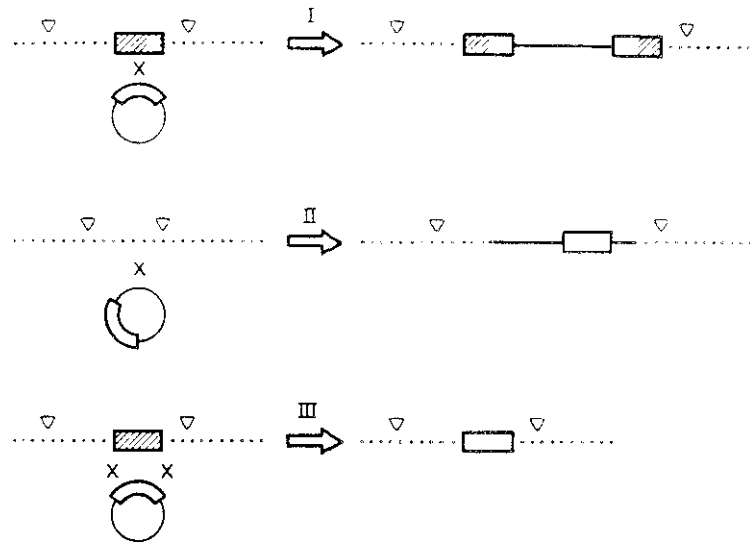
Existe un tercer tipo de marcador, que es el gen *amdS* de *A. nidulans* (Fig. 4C). Este gen codifica para una acetamidasa que confiere la capacidad de usar acetamida como única fuente de carbono y/o nitrógeno. Se ha empleado para transformar estirpes de *A. nidulans* con una delección completa del gen citado [380], o bien para transformar cepas de otras especies, como *P. chrysogenum*, que son incapaces de catabolizar la acetamida [38].

La información genética introducida en los hongos filamentosos puede mantenerse dentro de la célula de modo replicativo (independiente del genoma) o integrándose en algún

cromosoma, de modo análogo a como se produce en levadura. Desde el punto de vista industrial es preferible la transformación integrativa, ya que es más estable y no es necesario mantener la presión selectiva durante la fermentación. La transformación replicativa, sin embargo, tiene la ventaja de que se pueden clonar genes por complementación directa más fácilmente, como se verá en el apartado 3.C. Aunque hay excepciones, en la mayoría de los hongos filamentosos el DNA transformante se integra en el genoma. Debe mencionarse la secuencia *ans-1* de *A. nidulans* que, aunque no produce replicación autónoma en el hospedador homólogo, aumenta 50-100 veces la frecuencia de transformación integrativa [21]. Esta secuencia también aumenta la frecuencia de cotransformación [89] y ha servido para elaborar un sistema de transformación muy eficaz en *P. chrysogenum* [62].

Los tipos de integración del vector que se han detectado en hongos filamentosos son los mismos que se describieron originalmente en levadura [171] (Fig. 5). El tipo I supone un sobrecruzamiento entre el marcador y la zona homóloga correspondiente del genoma, con la consiguiente duplicación génica adyacente. Se produce una integración denominada homóloga. En el tipo II se produce una integración heteróloga (también llamada ectópica) debido a un suceso de recombinación ilegítimo, en el que aparentemente no hay relación de homología entre el DNA del vector y el genoma. El tipo III es equivalente a una conversión génica y da como resultado la sustitución del alelo residente por el marcador, fenómeno que se supone debido a dos sobrecruzamientos en la zona homóloga. También se puede llegar a una integración de tipo III si se produce un segundo sobrecruzamiento entre las zonas homólogas duplicadas en una integración de tipo I, con la posterior escisión de material. En hongos filamentosos es relativamente frecuente que haya más de una copia de vector en cada transformante de los tres tipos mencionados, e incluso varias copias integradas unas a continuación de otras (en tándem). Se ha demostrado que en la integración de tipo II en *S. cerevisiae* también interviene la ho-

INTRODUCCION



SONDA				
	GEN MARCADOR		PLASMIDO PROCARIOTA	
	CEPA RECEP	CEPA TRANSF	CEPA RECEP	CEPA TRANSF
Tipo I				
Tipo II				
Tipo III				

Fig. 5.- Destino del vector en la transformación integrativa de hongos filamentosos y levaduras.

En la parte superior se esquematizan los tipos de integración posibles según la interpretación que se hace por el método de Southern, que se muestra en la parte inferior de la figura.

La línea de puntos representa el genoma; la caja hueca, el marcador insertado en un plásmido procariota (línea sencilla). La región genómica homóloga con respecto al marcador se ha representado como una caja rayada. Los triángulos indican cortes idénticos de restricción, y las aspas, el lugar por donde se produce el sobrecruzamiento. Explicación en el texto.

Simplificado a partir del trabajo de Hinnen et al. [171].

mología, y en general se observa que los hongos filamentosos dependen menos que la levadura de secuencias homólogas para la integración del vector [118].

3.B. Metodología.

La mayoría de los protocolos de transformación de hongos filamentosos emplean protoplastos para que las células sean competentes a la entrada del DNA. Esto implica degradar la pared celular con una o varias enzimas líticas (Fig. 6). La digestión y todas las manipulaciones posteriores deben hacerse con una presión osmótica determinada (0,5-2,4 osmolar) para no romper la célula, que queda protegida únicamente por la membrana plasmática. Como estabilizador osmótico se emplean sales o azúcares. En la liberación de protoplastos a partir de micelio y su viabilidad posterior influyen factores como, por ejemplo, edad del micelio, medio de cultivo en el que ha crecido, tipo de enzima lítica y tiempo de incubación con ella, tipo y concentración de estabilizador osmótico, etc [91, 402].

Los protoplastos se purifican de los restos de micelio sin digerir y se lavan por centrifugación para eliminar la enzima lítica. A continuación se concentran en un volumen pequeño (0,1-1 mL) y se incuban con el DNA transformante, un tampón y cloruro cálcico para permeabilizar la membrana plasmática (Fig. 6). En general se usan 10^7 - 5×10^8 protoplastos y 1-20 μ g de DNA. La adición posterior de polietilenglicol produce aglomeración y fusión de protoplastos, con lo que presumiblemente se facilita la entrada del DNA transformante en el interior celular. Por último, la mezcla se siembra en placas de medio selectivo con estabilizador osmótico (ver apartado 3.A y Fig. 4).

Es importante hacer en paralelo un experimento de control sin DNA. Con ello se puede establecer si en los sistemas que emplean marcadores de auxotrofía existe reversión de la cepa receptora, y en los sistemas que emplean la selección por resis-

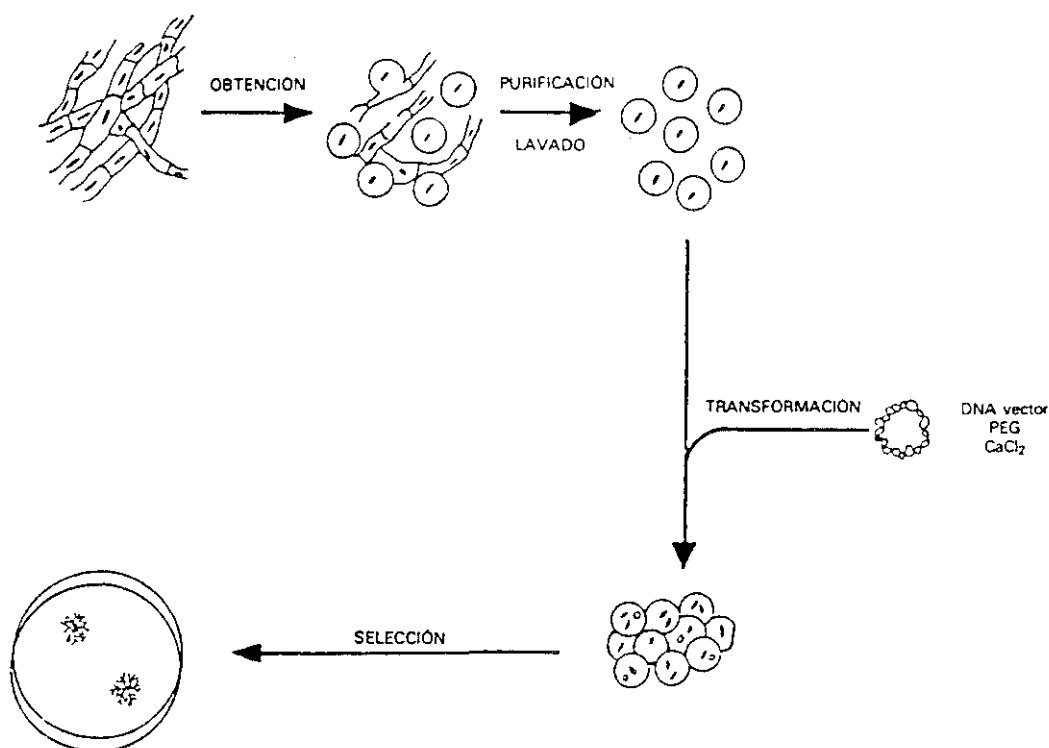


Fig. 6.- Esquema de un protocolo general para transformar protoplastos de hongos filamentosos. Tomado de González y Ramón [141].

tencia, si aparecen resistentes espontáneos.

Al cabo de algunos días, los protoplastos que han captado el DNA y pueden expresarlo regeneran la pared, se multiplican y forman una colonia. De las colonias regeneradas se hacen réplicas en medio selectivo y no selectivo para comprobar la estabilidad del fenotipo. Puede existir una proporción de clones que pierden el fenotipo transformante después de varias réplicas y que se denominan transformantes abortivos. La última comprobación de estabilidad debe hacerse a partir de un número grande de esporas producidas en medio no selectivo. En general la estabilidad mitótica de los clones transformados es alta, pero cuando tiene lugar la meiosis -en su caso-, la estabilidad es menor [118].

El análisis para determinar qué tipo de integración tienen

los transformantes (ver apartado 3.A y Fig. 5) se lleva a cabo extrayendo el DNA total, cortándolo con enzimas de restricción y haciendo una transferencia de Southern [369]. Como sondas radiactivas se utilizan distintos fragmentos del vector [171]. Para saber en qué cromosoma se ha integrado el DNA transformante se puede recurrir a análisis genético formal o a técnicas moleculares, como la electroforesis en campo pulsante.

Existen variaciones con respecto a lo que sería un método general de obtención y transformación de protoplastos como el apuntado más arriba (Fig. 6). Se ha descrito la transformación de protoplastos por electroporación [139,408], sin aumento sustancial de la frecuencia obtenida. También se ha comunicado un protocolo de transformación con el DNA encapsulado en liposomas, que consigue una frecuencia 20-40 veces superior con respecto a los controles sin encapsular [319]. Una alternativa a la preparación de protoplastos es la transformación de germinulas de *N. crassa* mediada por iones alcalinos [100].

3.C. Aplicaciones.

En el ámbito de mejorar la producción de antibióticos (ver apartado 4), la transformación tiene tres aplicaciones principales que se comentan a continuación.

1) **Confirmar la función de un gen clonado.** La complementación de una mutación previamente caracterizada con el alelo silvestre respectivo permite corroborar la función de un gen aislado. Como ejemplo puede mencionarse el caso del gen *cefG* de *C. acremonium* [157, 255]. En estos casos, no obstante, es importante considerar que el fenotipo mutante pueda revertirse por supresión extragénica. Para distinguir estas posibilidades se pueden utilizar mutaciones debidas a aberraciones cromosómicas como deleciones o inversiones. El hecho de que un fragmento de DNA que complementa un determinado fenotipo mutante detecte la

aberración cromosómica cuando se usa como sonda en experimentos de hibridación, es una demostración formal de que el fragmento clonado contiene el gen en estudio y no un supresor extragénico.

Si se supone cierta función para un gen clonado, se puede generar un alelo de pérdida de función. Para ello se hace una construcción *in vitro* en la que el gen en estudio está interrumpido por el marcador. Una integración de tipo III (con respecto al gen clonado) permite obtener transformantes con un alelo nulo por inactivación génica. El análisis de los transformantes y el estudio del fenotipo confirma la función del gen en cuestión. De este modo se demostró la clonación del gen *pcbAB* de *C. acremonium* [175].

2) Clonación directa. Los sistemas de transformación de hongos pueden ser una alternativa frente a otros métodos para clonar un gen. La clonación directa se basa en complementar la mutación de una cepa fúngica con una genoteca. Para ello son necesarios dos requisitos. En primer lugar, debe obtenerse una frecuencia suficientemente alta de transformación, de modo que, usando cantidades manejables de la genoteca, se pueda disponer de un número apropiado de clones transformados para tener una representación estadística del genoma. En segundo lugar, es necesario que el DNA transformante con el gen responsable de la complementación se pueda recuperar fácilmente.

Si se fija una probabilidad del 99 % para tener una representación estadística del genoma de *C. acremonium* (22.500 kb [358]), se necesitan unos 10.500 ó 21.000 clones al azar procedentes de una genoteca construida en plásmidos (con un inserto medio de 10 ó 5 kb, respectivamente); y 2.300 clones si se emplea una genoteca en cósmidos (considerando un inserto medio de 45 kb) [80]. Por tanto, los esfuerzos iniciales para clonar directamente en hongos filamentosos se dirigieron, o bien hacia aumentar la frecuencia de transformación con vectores plasmídicos, o bien a usar genotecas con insertos grandes, como las construidas en cósmidos [195].

Los vectores con replicación autónoma en levadura permiten obtener una frecuencia alta de transformación (10^3 - 10^5 transformantes/ μ g DNA) y su recuperación es sencilla, mediante extracción y transformación de *E. coli*. En hongos filamentosos, como se ha señalado en el apartado 3.A, la transformación suele ser integrativa. Aunque inicialmente se describieron secuencias que en parte conferían replicación autónoma del vector en *Neurospora crassa* y *Podospora anserina* [322], el primer ejemplo de clonación directa en hongos filamentosos empleando un vector replicativo se comunicó en *Mucor circinelloides* [397]. En los últimos años se han aislado varias secuencias con capacidad de replicación autónoma en hongos filamentosos, que en ocasiones se han usado para clonar genes directamente, por complementación del mutante receptor apropiado [cfr., p. ej., 5, 133, 167, 213, 325 y referencias que allí se citan].

La complementación directa también se puede llevar a cabo con vectores integrativos. En *Aspergillus nidulans*, por ejemplo, los plásmidos [196] o los cósmidos [419] sufren desrecombinación -con una frecuencia baja, pero detectable- y quedan libres espontáneamente, por lo que su recuperación es similar a la de los vectores con replicación autónoma. En otros casos es necesario digerir con enzimas de restricción total o parcialmente el DNA extraído de los transformantes complementados, tratarlo con DNA ligasa y transformar *E. coli* para recuperar los plásmidos de interés [22].

Tanto con vectores replicativos como con vectores integrativos, el DNA transformante que se recupera puede estar reorganizado. En el caso de vectores integrativos, además, la recuperación por digestión, ligación y transformación de *E. coli* no siempre es posible [118]. Una alternativa para aislar los plásmidos o cósmidos de interés es la transformación del mutante en rondas sucesivas, usando grupos de clones genómicos en los que aumenta progresivamente la frecuencia relativa del gen buscado (*sib selection*). De este modo no es necesario recuperar el DNA transformante a partir de la cepa fúngica, puesto que el gen

responsable de la complementación se va asociando a subdivisiones de la genoteca en *E. coli* en las que la complejidad es cada vez menor. Este método se ha aplicado para clonar genes por complementación de mutaciones de *N. crassa* con genotecas construidas en plásmidos [2] o en cósmidos [404].

3) **Estudio y alteración de la regulación génica.** Es la aplicación principal de los sistemas de transformación y obliga a tratar, a su vez, de varios métodos.

a) *Aumento de dosis génica.* La producción de un metabolito se puede aumentar introduciendo en una cepa múltiples copias de los genes implicados en su síntesis. Así ha ocurrido, como se verá en el apartado 4, con algunos genes estructurales directamente relacionados con la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos.

Si se aumenta el número de copias de una región de DNA con actividad reguladora en *cis*, se pueden titular proteínas reguladoras de transcripción que estén en cantidades limitantes y reconozcan dichas secuencias. De este modo se llega a delimitar con cierta precisión la secuencia de unión con la proteína reguladora [176, 177].

b) *Sustitución génica.* Permite cambiar un alelo del genoma por otro alelo manipulado *in vitro* que codifique para una proteína con características distintas de la original, incluso que no tenga actividad. El gen sustituido puede ser estructural o regulador. Posteriormente se estudia el efecto de tal cambio en los transformantes. La utilidad de este método radica en construir y sustituir alelos que, por ejemplo, codifiquen para una proteína que no muestre inhibición por producto final; o genes inactivados para que se produzca la acumulación de un determinado producto o se derive una vía metabólica; o genes con el promotor alterado para que tengan una regulación diferente.

El caso intuitivamente más sencillo para practicar una sustitución génica sería obtener una integración de tipo III, siempre que el alelo usado tenga selección dominante [266].

También se puede emplear la cotransformación [410]. Un tercer procedimiento es la sustitución en dos pasos. Esta última técnica implica que en primer lugar se produzca una integración de tipo I con la consiguiente duplicación génica. La recombinación posterior entre las zonas homólogas duplicadas escinde el marcador y el plásmido procariota, dejando el genoma receptor con la sustitución deseada en ocasiones [266].

c) *Fusión génica*. La fusión de un promotor -normalmente homólogo- con un gen -normalmente heterólogo- permite modular la expresión de este último en los clones transformados. La fusión génica tiene, a su vez, varias aplicaciones. El caso más sencillo es el de poder disponer de vectores eficaces para transformar por resistencia a drogas, como se señaló en el apartado 3.A. La fusión génica también se pueden llevar a cabo para facilitar la expresión de un gen heterólogo que confiera características de interés en la cepa de producción como, por ejemplo, la introducción de nuevas rutas biosintéticas [185] o el uso de nutrientes más baratos. Otro caso importante es el de poner genes estructurales homólogos responsables de la síntesis de un determinado metabolito bajo el control de un promotor fuerte. Por último, la fusión entre el promotor de un gen en estudio y un gen con actividad fácilmente cuantificable, como la β -galactosidasa de *E. coli*, hace posible el análisis de la regulación del promotor -alterado o no *in vitro*- en los transformantes [159].

d) *Clonación de promotores*. Si se construye una genoteca clonando fragmentos genómicos al azar en el extremo 5' de un gen de resistencia sin promotor y se transforma, los clones resistentes suelen albergar una fusión entre secuencias con actividad promotora y el gen de resistencia mencionado. En el caso de vectores replicativos, la recuperación es sencilla [132, 143, 226, 346], como se ha mencionado al tratar de la clonación directa. En el caso de vectores integrativos se puede recurrir a hacer una genoteca del transformante en fagos. Para aislar la fusión entre el promotor y el gen de resistencia se sondea la genoteca en fagos con secuencias del vector en el que construyó

la primera genoteca mencionada [388]. Otra posibilidad para recuperar fragmentos con actividad promotora es cortar el DNA de los transformantes con un enzima de restricción apropiado, tratarlo con DNA ligasa y transformar *E. coli*. La extracción de los plásmidos de la bacteria y la retransformación del hongo permite identificar y tener aislados promotores eficaces [187]. Los promotores aislados pueden ser útiles tanto en vectores de transformación como en vectores de expresión, mediante fusiones génicas.

e) *Clonación de alelos mutantes*. Cuando se transforma una cepa mutante con el alelo silvestre, si se produce una integración de tipo I y tras un suceso de desrecombinación como el anteriormente mencionado, se pueden recuperar el alelo silvestre o el alelo mutante [196]. Hay que destacar que para ello no es necesario disponer de una genoteca de la estirpe receptora.

4. TECNICAS DE DNA RECOMBINANTE EN LA FABRICACION DE ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS.

La productividad de una fermentación -y por tanto, la reducción de sus costes- depende de tres factores relacionados: las características genéticas de la cepa, su estado fisiológico (condicionado por el medio de cultivo, temperatura, modo de operación, etc.) y variables propias de la ingeniería. Para aumentar la productividad debe incidirse -siempre que sea posible- en los tres factores simultáneamente, y lograr así un resultado económico óptimo. Hay, a su vez, tres formas de mejorar genéticamente los microorganismos industriales: mutagénesis, recombinación *in vivo* e ingeniería genética (=técnicas de DNA recombinante). Cada una tiene sus ventajas y en ocasiones pueden usarse coordinadamente para mejorar la fermentación [24].

El método empleado históricamente, y que se sigue usando en la actualidad, es la mutagénesis y selección de mutantes que

proporcionan mayor título de antibiótico. Tiene la ventaja de que se requiere poco conocimiento genético y fisiológico de la rutas implicadas en la síntesis del producto de interés. A medida que ha avanzado tal conocimiento se han establecido criterios de selección racionales, basados en el uso de análogos estructurales o la resistencia a metales pesados, por ejemplo. Los procedimientos están automatizados y sujetos a control estadístico, de modo que permiten mejorar las cepas de forma presumiblemente rápida. Los títulos de las cepas productoras de penicilina han aumentado 4.000-5.000 veces desde que se empezó a aplicar esta técnica en la década de los años cuarenta, junto con medios de cultivo más apropiados y un diseño óptimo de la fermentación [310]. Es difícil conocer el título de las cepas industriales, puesto que se considera secreto empresarial. En la fermentación de penicilina es posible que actualmente se obtengan concentraciones superiores a los 50 g/L [252]. La fermentación para obtener cefalosporina C es menos eficaz que la de penicilina. Como dato orientativo, la cepa silvestre de *C. acremonium* produce entre 10 y 600 mg de cefalosporinas/L [255, 276], mientras que la cepa semi-industrial C-10 produce 18 g/L en matraz agitado [349]. La empresa Panlabs, dedicada a suministrar cepas y técnicas de fermentación a las industrias correspondientes, parte de una cepa de *C. acremonium* para su mejora posterior capaz de producir 25 g de cefalosporinas/L a los 6 días en fermentadores de 500 L. La mejora de cepas por medio de mutagénesis está revisada en las referencias 316, 331 y 332, entre otras.

La recombinación *in vivo*, junto con la mutagénesis, se emplea para construir cepas con diferentes combinaciones alélicas de distintos genes que mejoren la producción. Como se ha mencionado en el apartado 2, se pueden obtener recombinantes de *C. acremonium* mediante fusión de protoplastos. De este modo es relativamente sencillo combinar cepas que no están muy bien caracterizadas bioquímica o genéticamente [40]. Presenta el inconveniente de tener que introducir mutaciones (normalmente de

auxotrofía) en las estirpes que se quieren cruzar, lo que suele llevar asociado un efecto negativo sobre la producción de antibiótico. Si bien esta técnica ha servido para obtener una cepa de *P. chrysogenum* en la que se eliminaron características indeseables de los parentales [231], los resultados con *C. acremonium* han sido más limitados [296].

La mejora que se obtiene en las cepas de producción mediante técnicas de mutagénesis y selección tiende a ser cada vez menor. En la actualidad se piensa que podrá ser ventajoso desde el punto de vista económico recurrir a la Biología molecular [360]. Para mejorar las cepas con técnicas de DNA recombinante son necesarios tres requisitos principales: conocer los factores que limitan la síntesis del producto de interés; tener clonados los genes responsables para estudiarlos y manipularlos *in vitro*; y disponer de un sistema de transformación con el que introducir los genes en la misma cepa o en otra distinta. La ingeniería genética presenta la ventaja de que las modificaciones pueden hacerse de forma precisa -hasta el nivel de un nucleótido-, y carece de los inconvenientes de tener que exponer un genoma equilibrado a una dosis grande de mutágeno o al cruzamiento con otro genoma no del todo compatible.

Además de los genes implicados en la síntesis de cefalosporina C que se mencionaron en el apartado 2, se conoce la secuencia de los genes *pcbAB* de *A. nidulans* [246] y *P. chrysogenum* [103, 366]; *pcbC* de *A. nidulans* [324, 409] y *P. chrysogenum* [28, 67]; y *penDE* de *A. nidulans* [272, 384] y *P. chrysogenum* [30]. En ambas especies los genes forman una agrupación (*cluster*) en el orden *pcbAB-pcbC-penDE*, en la que la transcripción es divergente entre los genes *pcbAB* y *pcbC*, y en el mismo sentido en los genes *pcbC* y *penDE*.

Los genes para la síntesis de cefamicina C también están agrupados en bacterias [54, 75, 86, 385]. Se supone que la mayoría de los genes estructurales implicados en la síntesis de antibióticos β -lactámicos se transfirieron horizontalmente de un procariota a hongos de los que derivaron *P. chrysogenum*, *A.*

nidulans o *C. acremonium* [228, 305; revisado en 1 y 307].

En los procariotas que sintetizan antibióticos β -lactámicos se considera que el primer gen estructural de la ruta es el gen *lat* (lisina ϵ -aminotransferasa), ya que el ácido L- α -aminoadípico no es un intermediario obligado en la síntesis de lisina, como en hongos filamentosos [1]. Están secuenciados (siquiera en parte) todos los genes estructurales de *Streptomyces clavuligerus* -y en algunos casos, de otras especies procariotas- implicados directamente en la síntesis de desacetil-cefalosporina C: *lat* [84, 385]; *pcbAB* [85, 385]; *pcbC* [129, 234, 351, 352, 409]; *cefD* [220]; *cefE* [219]; y *cefF* [221].

La aplicación de las técnicas de DNA recombinante en la fabricación de antibióticos β -lactámicos, además de poder mejorar la productividad de las cepas (y por tanto, el método de producción existente), tiene una opción más importante: la obtención de antibióticos nuevos. Las posibilidades que ofrece la ingeniería genética se pueden dividir en cuatro apartados que se tratarán a continuación.

1) Aumento de la productividad.

La producción de un metabolito se puede potenciar, en principio, incrementando la transcripción de los genes estructurales directamente implicados en su síntesis. Para ello se puede aumentar la dosis génica, usar promotores fuertes o alterar -en sentido amplio- los mecanismos de regulación de la ruta.

Algunas de las cepas industriales empleadas en la producción de penicilina tienen una zona de 35-40 kb amplificada entre 8 y 16 veces con respecto a la cepa silvestre en la que están incluidos los genes *pcbC* y *penDE* [29, 365], por lo que posiblemente también esté incluido el gen *pcbAB*. La cantidad de mensajero del gen *pcbC* es 32-64 veces mayor que el de la cepa silvestre, lo que indica que la transcripción está desregulada en estas estirpes industriales [365]. En *C. acremonium* no se ha descrito tal amplificación en el DNA, aunque sí se ha comunicado

la mayor cantidad del mensajero del gen *pcbC* en cepas con alta productividad de cefalosporina [225]. Además, se han descrito polimorfismos en la zona del gen *pcbC* [363] y en el DNA ribosómico [405], lo que prueba que en las cepas industriales ha habido reorganizaciones en los cromosomas.

El aumento del número de copias del gen *pcbC* no ha logrado mejorar la producción de antibiótico en transformantes de *A. nidulans*, *P. chrysogenum* o *C. acremonium* en distintos laboratorios. Sin embargo, se ha conseguido un aumento medio de un 15% de cefalosporina C en una cepa industrial de *C. acremonium*, al introducirle un fragmento de DNA con una copia adicional del gen *cefEF* (en el que también iba incluido el gen *cefG*, como se ha sabido posteriormente [255]). El aumento de cefalosporina C ocurre en detrimento de la concentración de penicilina N y desacetoxi-cefalosporina C. La cepa mejorada puede emplearse en fermentadores piloto de 150 L [359].

La presencia de un 10-20% de desacetil-cefalosporina C en las fermentaciones de *C. acremonium* es un inconveniente que dificulta la purificación de la cefalosporina C y disminuye la calidad del 7-ACA obtenido más tarde [242]. El transcrito del gen *cefG* es poco abundante [157]. El aumento de dosis del gen *cefG* ha permitido obtener transformantes de la cepa silvestre de *C. acremonium* que producen hasta tres veces más cefalosporina C, aunque no se detalla si este incremento va acompañado de la disminución de desacetil-cefalosporina C [255].

También se han conseguido transformantes de *P. chrysogenum* con copias adicionales de los genes *pcbC* y *penDE* que producen hasta un 40% más de penicilina V, si bien estos experimentos tampoco se han llevado a cabo con una cepa industrial ni se han pasado a escala de fermentador [398].

2) Regulación génica.

El aislamiento, estudio, manipulación y reintroducción de genes relacionados con la síntesis de antibióticos β -lactámicos será, en último término, más importante que la obtención de

transformantes con múltiples copias de los genes estructurales para aumentar la productividad (cfr. el apartado anterior y el epígrafe 3.C sobre aplicaciones de la transformación). Deberán estudiarse genes implicados en suministrar más precursores del metabolismo primario o del medio de cultivo a la ruta biosintética, así como los genes reguladores de todos estos circuitos [180, 244, 403]. Estudiar los promotores de los genes estructurales ya clonados es el primer paso para conocer los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de estos antibióticos y poder alterarlos posteriormente de forma controlada.

Aunque *A. nidulans* produce poca penicilina, la ruta biosintética y la organización de los tres genes implicados son idénticas a las de *P. chrysogenum* y común a *C. acremonium* hasta la formación de isopenicilina N. La genética clásica y molecular de *A. nidulans* están muy desarrolladas y posee gran variedad de rutas metabólicas, lo que hace de esta especie un organismo modelo para los estudios de regulación génica en general [6, 92], y en particular del control genético de los genes estructurales directamente implicados en la producción de penicilina [324; ampliamente revisado en la referencia 244].

En *A. nidulans* existen como mínimo dos circuitos de regulación en la síntesis de penicilina. En primer lugar, tanto el gen *pcbC* [304] como los demás genes estructurales de la ruta [245] están regulados al menos a nivel de transcripción. Se ha demostrado que existe un control temporal en la expresión del gen *pcbC* mediante análisis del transcrito por el método de Northern [304] o con fusiones génicas *pcbC':::lacZ* [140], siendo máximo el nivel estacionario del mensajero durante las fases tardías del ciclo de crecimiento. Posteriormente se ha demostrado que el gen *pcbC* está sujeto a represión por catabolito de carbono. De este modo, el control temporal de la expresión puede explicarse por la desrepresión de la transcripción cuando la concentración de una fuente de carbono represora disminuye por debajo del umbral necesario para causar dicho efecto [115].

Un segundo circuito de regulación está mediado por las aguas de maceración de maíz (*corn steep liquor*, CSL). El CSL es un subproducto heterogéneo con vitaminas, minerales, aminoácidos y otros compuestos que se añade en las fermentaciones industriales de antibióticos β -lactámicos para aumentar su rendimiento [237, 268]. La adición de CSL estimula la transcripción de los tres genes estructurales directamente involucrados en la síntesis de penicilina [245, 306, 307].

En *C. acremonium* también se ha demostrado que la regulación del gen *pcbC* ocurre a nivel de transcripción [362]. Se ha determinado con cierta aproximación la zona en que comienza a transcribirse el gen *pcbAB* [156] y se han mapeado con precisión los puntos de inicio de transcripción de los genes *pcbC* [362] y *cefG* [255].

3) Obtención de nuevos compuestos β -lactámicos por fermentación.

Aunque la mayoría de las cefalosporinas de uso clínico se obtienen a partir de cefalosporina C y a través del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) -como se mencionó en el apartado 1 de esta Introducción-, en ocasiones se emplea el intermediario 7-amino-desacetil-cefalosporánico (7-ADICA). También se puede partir de cefamicina C e incluso de penicilina. Si se parte de penicilina, el intermediario empleado es el ácido 7-amino-desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA ó 7-ADOCA) [revisado en 52 y 166]. En cualquiera de los casos mencionados, estas conversiones se hacen por métodos químicos, con un coste alto y un problema medioambiental debido a los solventes utilizados. Existen procedimientos enzimáticos o mixtos químico-enzimáticos para la conversión de cefalosporina C en 7-ACA [cfr. 76, 181, 183, 185, 257, 360, 391 y referencias allí citadas], que posiblemente se estén implantando en la industria. Una vía alternativa para obtener los intermediarios de síntesis directamente en los caldos de fermentación es la introducción de nuevas rutas biosintéticas en las cepas productoras de antibióticos β -lactámicos.

Se ha conseguido la producción de 7-ACA [185] o de 7-ADICA [127] en transformantes de *C. acremonium*, aunque en unas concentraciones que todavía no permiten el paso a la escala industrial. Para ello se introdujeron los genes de la D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solani* y la cefalosporina acilasa de *Pseudomonas diminuta* bajo el control del promotor y el terminador del gen *alp* de *C. acremonium*, que codifica para la proteasa alcalina.

Se ha propuesto un procedimiento mixto (biosintético y enzimático) para la obtención de 7-ADCA. Tal esquema supondría introducir el gen *cefE* (penicilina N expandasa) en cepas de *P. chrysogenum*. Suministrando ácido fenoxiacético se podría obtener desacetoxi-cefalosporina V, fácilmente extraíble de los caldos de fermentación con métodos similares a los desarrollados para la penicilina G ó V. A partir de desacetoxi-cefalosporina V se podría obtener 7-ADCA por vía enzimática [180]. Como paso preliminar se han conseguido transformantes de *P. chrysogenum* que expresan el gen *cefE* de *S. clavuligerus* y producen desacetoxi-cefalosporina C bajo el control del promotor del gen *pcbC* de origen fúngico. Se espera que modificando *in vitro* el gen *cefE* se pueda lograr que la penicilina N expandasa acepte mejor la penicilina V que su sustrato natural [65].

También se ha comunicado la producción de desacetoxi-cefalosporina C en transformantes de una cepa industrial de *P. chrysogenum*, introduciendo los genes *cefD* y *cefE* de *S. clavuligerus*. El gen *cefD* se puso bajo el control del promotor y el terminador del gen *pcbC* de *P. chrysogenum*, y el gen *cefE*, bajo el control del promotor y el terminador del gen *penDE* del mismo origen [66]. Por vía enzimática se podría eliminar la cadena lateral de α -aminoadípico y obtener ácido 7-ADCA posteriormente [360]. Para mejorar la baja producción de desacetoxi-cefalosporina C en los transformantes sería necesario eliminar la actividad acil-transferasa (gen *penDE*), de modo que no hubiese competencia por la isopenicilina N entre ambas rutas. El problema que surge es poder anular el gen *penDE*, presente en

múltiples copias en las cepas de producción. Ante tal situación, se propone expresar RNAs complementarios (antisense) al transcrito del gen citado [66].

La introducción del gen *penDE* de *P. chrysogenum* en *C. acremonium* permite obtener penicilina G en los transformantes [155]. Estos intentos de combinación y manipulación de rutas biosintéticas abren la posibilidad futura de fabricar antibióticos nuevos (ver también el siguiente apartado), de modo similar a como se ha llevado a cabo en especies de *Streptomyces* [119, 173].

4) Ingeniería de enzimas.

El hecho de tener clonados los genes implicados en la síntesis o modificación de antibióticos β -lactámicos permite sobreexpresarlos en *E. coli* para disponer de gran cantidad de enzima, que se puede purificar más fácilmente. El gen en cuestión puede estar mutagenizado de forma precisa *in vitro*. Con ello surgen dos posibilidades importantes. La primera es poder emprender estudios básicos y aplicados de las enzimas involucradas en la síntesis de estos antibióticos. La segunda posibilidad es recurrir a la técnica de las enzimas inmovilizadas para la producción industrial [193].

Se ha sobreproducido en *E. coli* la proteína de los siguientes genes: *lat* de *S. clavuligerus* [385]; *pcbC* de *C. acremonium* [18, 19, 292, 337], *P. chrysogenum* [19, 67], *A. nidulans* [19, 324, 409], o de diversas especies de bacterias [111, 194, 229, 409]; *cefD* [220], *cefE* [219] y *cefF* [221] de *S. clavuligerus*; *cefEF* de *C. acremonium* [339]; y *penDE* de *P. chrysogenum* [384]. También se han sobreexpresado en *E. coli* otros genes relacionados con la obtención de 7-ACA por vía enzimática [181, 183, 256, 360 y referencias allí citadas].

Se han llevado a cabo estudios para determinar la estructura tridimensional, la localización del centro activo, el mecanismo de reacción o los distintos sustratos que pueden aceptar estas enzimas. La isopenicilina N sintetasa [15] y la penicilina N

expandasa/hidroxilasa [16] de *C. acremonium* producidas en *E. coli* aceptan y procesan los sustratos del mismo modo que las enzimas fúngicas. En la isopenicilina N sintetasa de *C. acremonium* obtenida a partir de *E. coli* se ha determinado el papel de dos restos de cisteína -conservados en todas las proteínas de este tipo que se conocen- en la actividad y la estabilidad del enzima [222, 338]. Muchos estudios sobre los sustratos que aceptan estas enzimas -y por tanto, la síntesis de antibióticos nuevos- son anteriores a la clonación y sobreexpresión de los genes correspondientes [consultar las revisiones 17, 180, 244, 253, 282, 360 y 414].

Los genes clonados y alterados por mutagénesis dirigida podrían dar lugar a enzimas con mayor estabilidad, mayor actividad o una especificidad alterada para aceptar sustratos distintos de los que reconocen naturalmente. Las cepas transformadas con los genes modificados podrían conseguir fermentaciones más eficaces u obtener compuestos β -lactámicos nuevos dependiendo de los sustratos añadidos [317].

Las enzimas, modificadas o no, pueden usarse inmovilizadas en reactores para llevar a cabo: A) *biosíntesis directa*, con sustratos naturales o artificiales que no permean las células o que compiten con otra ruta metabólica; B) *semisíntesis*, sustituyendo pasos que actualmente sólo se pueden hacer por vía química y que resultan costosos; C) *obtención de nuevos núcleos β -lactámicos*, con actividad antibiótica *per se* o como punto de partida para su modificación química. En cualquiera de los casos surge la posibilidad de fabricar antibióticos nuevos, lo que puede ser una alternativa importante frente a su búsqueda en el medio natural (*screening*), en donde cada vez será más difícil encontrarlos [403].

En la fabricación de antibióticos β -lactámicos se tiene experiencia con las penicilina-acilasas inmovilizadas. Estas enzimas catalizan la formación de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) a partir de penicilinas [350]. El gen correspondiente de varios microorganismos está clonado [cfr. 203, 394 y referencias

allí citadas]. El 6-APA es el compuesto de partida para la síntesis química de las penicilinas semisintéticas de uso clínico [166, 243]. Se ha apuntado la posibilidad de modificar los genes de las penicilina-acilasas para lograr actividad cefalosporina C-acetil hidrolasa y obtener de este modo el intermediario de síntesis 7-ACA a partir de cefalosporina C por vía enzimática [394].

Los antibióticos β -lactámicos no sólo actúan como agentes antiinfecciosos, puesto que también interaccionan con las células eucariotas causándoles muy pocos efectos tóxicos [277]. Basándose en este hecho se les han buscado otros usos clínicos distintos de la terapia antibacteriana que se ha empleado hasta ahora. Por ejemplo, las cefalosporinas modificadas en el sustituyente del carbono 4 inhiben la elastasa de leucocitos, una enzima que degrada la elastina y que es el principal agente en la inducción del enfisema pulmonar [104]. Si se consigue mantener la baja toxicidad de los antibióticos β -lactámicos, queda patente la utilidad de contribuir a manipular su síntesis con técnicas de DNA recombinante [317].

5. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Cuando se empezó este estudio se habían desarrollado y patentado dos sistemas para transformar *C. acremonium*: por resistencia a higromicina B mediante el gen HPT (higromicina B fosfotransferasa) [71, 72, 315] y por resistencia a G418 mediante el gen que confiere resistencia a kanamicina/neomicina/G418 (aminoglucósido 3'-fosfotransferasa I) del Tn903 [298-300]. Estos dos sistemas de transformación fueron los primeros en describirse para hongos productores de antibióticos β -lactámicos de interés industrial.

El inconveniente que presentaban ambos procedimientos era que se obtenía una frecuencia muy baja de transformación (<1

transformante/ μ g de DNA). Con esta frecuencia resultaban impracticables manipulaciones como, por ejemplo, complementar mutantes de *C. acremonium* con una genoteca, hacer interrupciones génicas como se había descrito en *N. crassa* [290] o hacer sustituciones génicas como se había comunicado en *A. nidulans* [266]. En el sistema basado en la selección con G418 aparecían falsos positivos, fenómeno que disminuía (aunque no era totalmente eliminado) al insertar el promotor de la alcohol deshidrogenasa de levadura en fase con el gen de resistencia. La inclusión de secuencias de *C. acremonium* que confieren replicación autónoma en levadura (ARS) no aumentaba la frecuencia de transformación en ninguno de los dos sistemas mencionados ni producía replicación autónoma del vector.

Para mejorar la eficacia de transformación se planteó el objetivo global de elaborar otro sistema, clonando algún gen propio de *C. acremonium*. El procedimiento podía basarse en la complementación de mutantes auxótrofos o en la resistencia a drogas. En este último caso, el método podría aplicarse a otras cepas de esta especie sin necesidad de obtener mutantes receptores. Se eligió un gen estructural que codifica para la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMPdecase) por tres motivos:

A) Se disponía del gen equivalente (*pyr-4*) de *N. crassa* [57, 279] y de una cepa con la mutación *pyrF* de *E. coli* [20], amablemente cedidos por el Prof. A. Radford (Universidad de Leeds, Inglaterra). Por tanto, la clonación del gen homólogo de *C. acremonium* se podía intentar por dos métodos: por hibridación, usando como sonda heteróloga el gen de *N. crassa*; o por complementación de la mutación *pyrF* de *E. coli* con una genoteca de *C. acremonium*. El gen de *N. crassa* era el de la especie evolutivamente más cercana a *C. acremonium* [77, 174] de entre los clonados en aquel momento: rata [202], ratón [285], levadura [12, 329], *Candida albicans* [136], *Escherichia coli* [105, 191] y *Desulfovibrio vulgaris* [235].

B) Se había descrito un método para la selección positiva

preferente de mutaciones de pérdida de función en este gen en levadura y otras especies [41]. Dicho método se basa en que las estirpes afectadas en el gen de la OMPdecasea pueden crecer en presencia del ácido 5-fluororótico (FOA), mientras que la cepa silvestre no puede hacerlo. El FOA podía facilitar la obtención del auxótrofo receptor correspondiente en el caso de un sistema de transformación por complementación.

C) Se conocía la secuencia del gen que codifica para la isopenicilina N sintetasa (*pcbC*) de *C. acremonium* [337], por lo que dicho gen se podía clonar mediante hibridación homóloga sondeando una genoteca con un oligonucleótido sintético. El gen *pcbC* está implicado en el metabolismo secundario, mientras que el gen de la OMPdecasea está implicado en el metabolismo primario [107]. Por consiguiente, si se construía un vector que albergase una fusión entre el promotor de un gen del metabolismo primario y un gen de resistencia a alguna droga a la que *C. acremonium* fuera sensible, cabía pensar que la expresión de resistencia ocurriese desde que los protoplastos transformados comienzan a regenerar en placa. Esto permitiría una selección apropiada en el caso de un sistema de transformación por resistencia.

En consecuencia, los objetivos concretos de este estudio eran los siguientes:

1º) Clonar el gen estructural que codifica para la OMPdecasea de *C. acremonium* y secuenciarlo para distinguir el promotor de la región estructural.

2º) Obtener mutantes auxótrofos de *C. acremonium* afectados en el gen de la OMPdecasea.

3º) Transformar protoplastos de los mutantes auxótrofos citados o transformar protoplastos de estirpes protótrofas por resistencia a alguna droga con el concurso del promotor clonado.

Por otra parte, la secuencia del gen estructural permitiría contribuir al conocimiento de la situación evolutiva de *C. acremonium* mediante criterios moleculares.

El plan seguido para la consecución del objetivo global de mejorar la transformación de *C. acremonium* se esquematiza en la

Figura 7, y guiará en líneas generales la exposición de resultados de este trabajo.

Parte de este estudio ya se ha publicado: la clonación del gen [400] y la secuencia de la zona estructural [399].

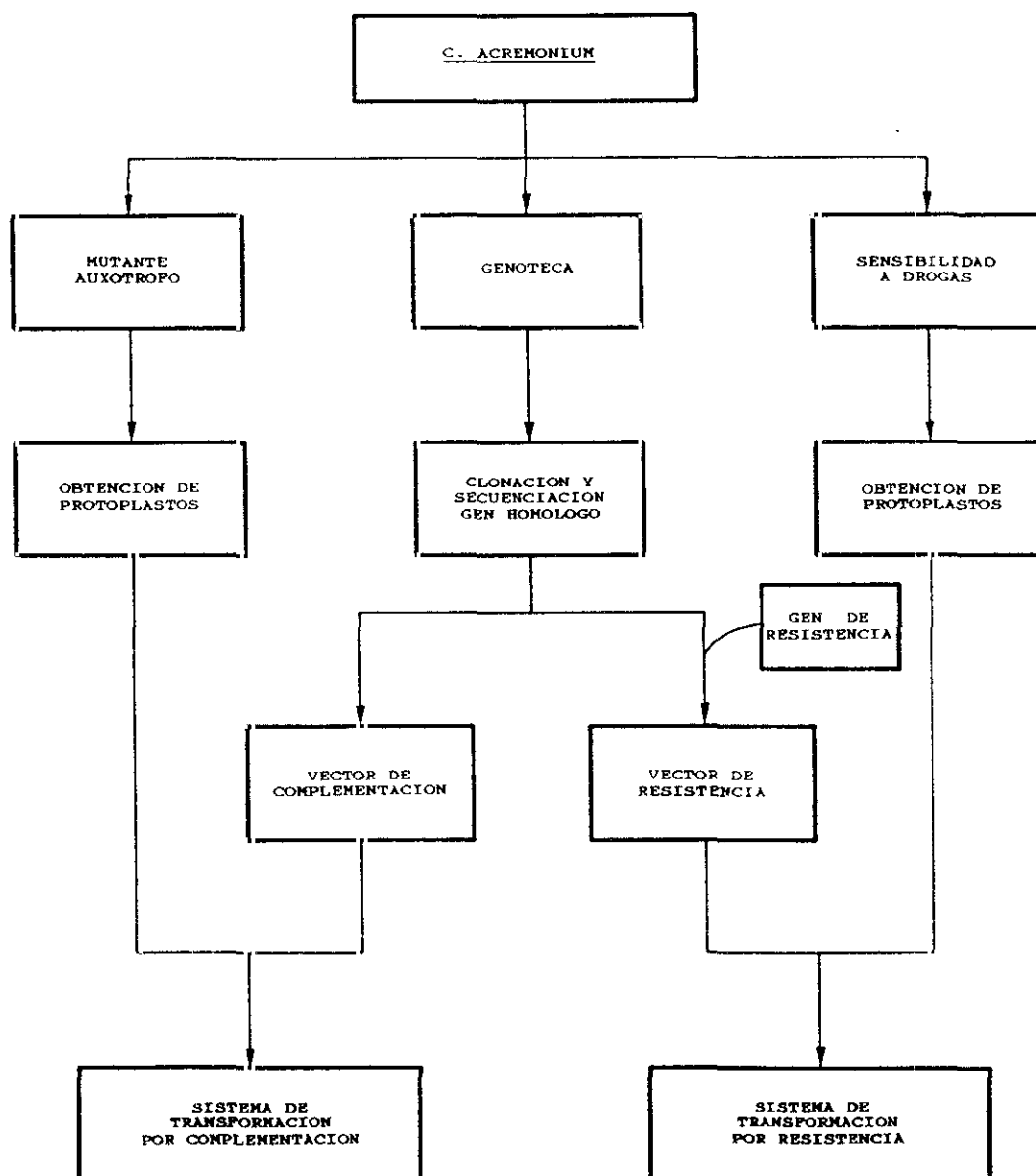


Fig. 7.- Plan seguido para desarrollar un sistema de transformación en *C. acremonium*.

II. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES.

1.A. Cepas.

Acremonium chrysogenum (*Cephalosporium acremonium*) ATCC 11550. Es el aislado original de G. Brotzu [51] y se considera la estirpe silvestre.

Acremonium chrysogenum (*Cephalosporium acremonium*) ATCC 48272. Estirpe derivada de la anterior por rondas sucesivas de mutagénesis para obtener mayor producción de cefalosporina C. Cedida por la empresa Panlabs al ámbito académico [97].

Todas las estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo derivan de la cepa K-12. Las mutaciones de los genotipos o fenotipos que se detallan a continuación están descritas en la revisión de Bachmann [14].

E. coli DH1 [161]. F^- *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44*. Se usó para amplificar plásmidos por su alta frecuencia de transformación y para evitar la formación de multímeros.

E. coli FB1009 [20]. F' (*codA lacY tonA tsx phx supE susnorB vtr str^s*) *argG thr ilvA alnA pyrF(zjj::Tn10(Tc^r)) leu his hsdR thi*. Se utilizó para complementar la mutación *pyrF* con DNA de *C. acremonium*.

E. coli JM103 [264]. F' (*traD36 proAB Δ(lacZ)M15 lacI^s*) *Δ(lac-pro) thi-1 strA supE endA1 sbcBC hsdR4*. Utilizada para transfectar con DNA bicatenario de fagos recombinantes derivados de la serie M13 y obtener DNA monocatenario para la secuenciación de los insertos clonados.

E. coli MC4100 [69, 251]. F^- *araD139 Δ(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR recA56*. Empleada para estudiar la expresión de la proteína codificada por el gen clonado de *C. acremonium* en un sistema de maxicélulas.

E. coli Q358 [123]. F^- *hsdR(r_k⁻, m_k⁺) supE ø80^r*. Estirpe permisiva para el bacteriófago λEMBL4. Se usó como cepa

indicadora para el rastreo de una genoteca de *C. acremonium* ATCC 11550 construida en el vector citado (cfr. el apartado 1.B) y la amplificación de los fagos aislados.

1.B. Vectores y derivados.

pFB6 [22, 57]. Plásmido recombinante entre un derivado de pBR322 y un fragmento de 4,2 kb con extremos *Sau3A* que contiene el gen *pyr-4* de *N. crassa* [279]. Tiene un tamaño de 8,3 kb y es resistente a ampicilina. Se empleó como punto de partida para clonar el gen correspondiente *C. acremonium* por hibridación heteróloga.

Genoteca de *C. acremonium*. Construida en el bacteriófago λ EMBL4 [123] por digestión parcial con *Sau3A* del DNA fúngico y ligación en el sitio *Bam*HI del vector. Posee un inserto medio de 16 kb [291, 292]. Se sondeó con el gen *pyr-4* de *N. crassa* en condiciones permisivas para clonar el gen equivalente de *C. acremonium*.

Plásmidos de la serie pUC. Vectores de clonación en *E. coli* de uso generalizado. En este trabajo se emplearon los plásmidos pUC12, pUC13 [265, 401] y pUC18 [417].

Bacteriófagos de la serie M13. Se utilizaron como vectores de clonación de fragmentos de DNA de *C. acremonium* y obtener DNA de banda simple para su secuenciación posterior. Se emplearon los fagos M13mp8, M13mp9 [265], M13mp18 y M13mp19 [417].

pUT713 (Fig. 8). Es un plásmido comercial (CAYLA, Toulouse, Francia) derivado de pUC19 -y por tanto, resistente a ampicilina- que contiene el gen *Shble* de *Streptoalloteichus hindustanus* sin promotor. Este gen confiere resistencia a fleomicina. Delante del gen *Shble* posee sitios únicos de clonación en los que se pueden insertar fragmentos de DNA con actividad promotora. Se usó en la construcción de un vector para transformar cepas de *C. acremonium*.

SUC₁

SacI SmaI NcoI
EcoRI KpnI BamHI BalI
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCatggccaag

SUC₂

SfiI
ApaI SacII
BglII NotI ClaI
AGATCTGGGCCCATGCGGCCGCGGATCGAT

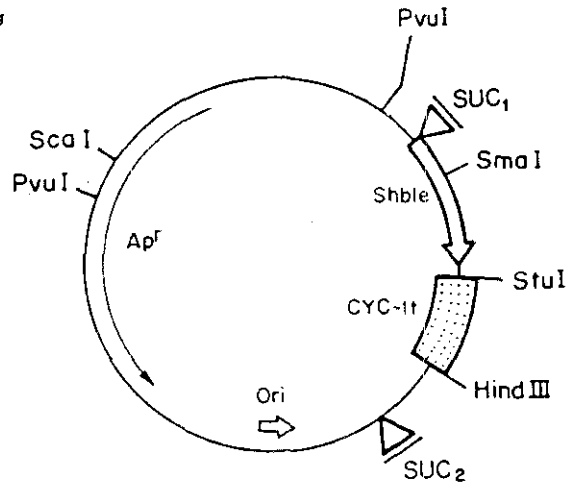


Fig. 8.- Esquema a escala de pUT713 [60]. Tiene un tamaño de 3.243 pb. En línea sencilla se representa la parte correspondiente a pUC19 [417], indicándose con la flecha de la izquierda la porción correspondiente al gen de la β -lactamasa. La flecha pequeña de la parte inferior señala el origen de replicación. La flecha hueca representa el gen *Shble* [108], y la caja punteada, el terminador del gen *CYC-1* de *S. cerevisiae* [368]. Se detallan los sitios únicos de clonación (SUC₁ y SUC₂), en donde las letras minúsculas a continuación de los SUC₁ indican los primeros tripletes del gen *Shble*.

1.C. Medios de cultivo.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio L líquido o sólido [248] o en medio líquido TB [375]. En el caso de tener que añadir ampicilina (sal sódica) se hizo para dejarla con una concentración final de 150 μ g/mL. En los experimentos con *E. coli* FB1009 se empleó el medio mínimo M9 en placas [248], suplementado

MATERIALES

con arginina, treonina, isoleucina, alanina, leucina, histidina, tiamina (y uracilo, en su caso) en una concentración final de 50 $\mu\text{g/mL}$, salvo la tiamina (1 $\mu\text{g/mL}$). En este medio la ampicilina se usó con una concentración final de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para transfectar *E. coli* JM103 con DNA de los fagos de la serie M13 se partió de cultivos crecidos en medio mínimo M63 [267] con 1 $\mu\text{g/mL}$ de tiamina.

Los medios para el crecimiento y la obtención y transformación de protoplastos de *C. acremonium* se detallan a continuación (cfr. también los apartados 1.D y 2.B). Las cantidades se expresan en g/L.

MDL (Medio definido líquido; modificado de [160]).

KH_2PO_4	15
K_2HPO_4	21
Na_2SO_4	0,65
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,18
MnSO_4	0,03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,008
CaCl_2	0,06
FeSO_4	0,0015
L-asparagina	7,5
Glucosa	2
Sacarosa	36

Los distintos componentes se pueden usar en soluciones concentradas del siguiente modo: fosfatos (10 \times), sulfatos -salvo el FeSO_4 - (100 \times), CaCl_2 (1.000 \times), FeSO_4 (1.000 \times), L-asparagina (4 \times), glucosa (100 \times) y sacarosa (10 \times). Se esterilizan en autoclave (121 °C durante 20 minutos), excepto la L-asparagina, que se esteriliza por filtración (0,22 μm).

MEDIOS DE CULTIVO

MMA (Medio mínimo de Czapek-Dox, sólido).

NaNO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1
KCl	0,5
FeSO ₄	0,5
MgSO ₄	0,01
Sacarosa	30
Agar	15

Cada una de las sales se puede preparar y conservar en soluciones concentradas 100×. La sacarosa se puede preparar 10×. El pH se ajusta a 6,7-6,8 con HCl 2N. Se esteriliza en autoclave.

MCA (Medio complejo sólido).

Extracto de malta	5
Extracto de levadura	5
Sacarosa	5
Agar	20

Esterilización en autoclave.

MRP (Medio de regeneración de protoplastos, sólido). Idéntico a MMA pero con 410 g de sacarosa/L (=1,2 M). Es recomendable usar agar purificado Oxoid.

MRPb (Cobertura blanda para MRP). Idéntico a MRP pero con agarosa de bajo punto de fusión (BioRad) en concentración final del 0,8 %.

1.D. Soluciones y tampones.

Las soluciones y tampones empleados en las técnicas de DNA recombinante y en la manipulación de *E. coli* están descritos en textos generales [10, 248, 336]. Sólo se detallan las soluciones y tampones específicos para la manipulación de *C. acremonium* (ver también los apartados 1.C y 2.B).

TLP (tampón para liberación de protoplastos).

MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2	M
Tampón fosfato, pH 5,8	10	mM
Seroalbúmina bovina	0,6	mg/mL
Novozym 234	3	mg/mL

Para la preparación del tampón fosfato [142] se disuelven 2,76 g de Na₂HPO₄.H₂O en 100 mL de H₂O (=solución A); y 0,54 g de NaH₂PO₄.7H₂O en 10 mL de H₂O (=solución B). La mezcla de 92 mL de la solución A y 8 mL de la solución B hacen 100 mL de tampón fosfato 0,2 M, pH 5,8 (concentrado 20 veces con respecto a como se usa en el TLP). Se esteriliza en autoclave junto con el MgSO₄, reajustando previamente el pH a 5,8 y teniendo en cuenta el aumento de volumen que se produce posteriormente al añadir la seroalbúmina bovina (Fracción V, Sigma). Esta última se usa a partir de una solución previamente preparada con 12 mg/mL, estéril por filtración (0,45 µm) y que se puede conservar a -20 °C. La enzima lítica Novozym 234 (Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) se añade a la solución anterior, se resuspende con ayuda de vórtex y todo ello se esteriliza por filtración (0,45 µm) en el momento de su uso.

TPP (Tampón de purificación de protoplastos). Contiene 0,6 M Sorbitol y 100 mM Tris-HCl, pH 7,5. Se esteriliza en autoclave.

STC. Idéntico al TPP, pero con CaCl₂ 10 mM.

PTC. Idéntico al tampón STC, pero con polietilenglicol 6000 (Merck) al 60 % (p/v) en lugar de sorbitol.

1.E. Productos radiactivos.

Se adquirieron de la marca Amersham. Para las hibridaciones de DNA inmovilizado en filtros de nitrocelulosa (transferencias de Southern) se empleó ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP de actividad específica 400 Ci/mmol cuando la sonda se marcó por el método de la incisión ambulante (*nick translation*); y ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP de 3.000 Ci/mmol, cuando el método seguido para marcar la sonda fue el del iniciador al azar (*random priming*). En los experimentos con maxicélulas se usó L-(^{35}S) metionina de 1.130 Ci/mmol. Para la secuenciación de DNA se empleó ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (actividad específica de 400 Ci/mmol) en caso de utilizar el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I; y ($\alpha^{35}\text{S}$)dATP (1.000 Ci/mmol) en caso de usar la DNA polimerasa modificada del bacteriófago T7. (1Ci = 1 Curio = $3,7 \times 10^{10}$ desintegraciones/segundo).

1.F. Otros.

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica, generalmente de las marcas Sigma, Merck, Fluka o Kodak. Los componentes para medios microbiológicos se adquirieron de Difco o de Oxoid. Se emplearon enzimas de restricción de las marcas Amersham, BioLabs o Boehringer; fosfatasa alcalina y fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, de Amersham; RNasa A, lisozima y proteinasa K, de Sigma; y DNasa I de Worthington. Para las transferencias de Southern se usaron filtros de nitrocelulosa de Schleicher & Schuell BA85 o Millipore HATF en el caso de hibridación en colonia. La procedencia de otros materiales o productos más específicos se detalla en el texto.

2. METODOS.

2.A. Manipulación de *E. coli* y técnicas de DNA recombinante.

Estos protocolos están descritos con detalle en textos generales [10, 248, 336], por lo que a continuación sólo se incluyen los datos de mayor interés.

1) Hibridaciones de DNA en filtros de nitrocelulosa.

Las hibridaciones en condiciones permisivas con una sonda heteróloga (apartados de Resultados 1.A á 1.D) se hicieron a 37 °C en una solución compuesta por 50 % de formamida, 5×SSC, 5× solución de Denhardt, 0,1 % SDS y 50 µg/mL de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se lavaron a temperatura ambiente dos veces en 2×SSC, 0,1 % de SDS; y una vez en 0,5×SSC, 0,1 % SDS. La sonda se marcó por el método de la incisión ambulante (*nick translation*). Se usaron 0,5-1 µg de sonda marcada con una actividad específica de $\sim 10^7$ cpm/µg DNA (Cerenkow).

Para el análisis de transformantes (apartado 10 de Resultados) se emplearon condiciones de hibridación homóloga, similares a las descritas más arriba, pero a una temperatura de 42 °C. Se hicieron dos lavados en 2×SSC, 0,1 % SDS; un lavado en 0,2×SSC, 0,1 % SDS; y un último lavado igual que el anterior pero a 60 °C. El marcaje de las sondas (~ 10 ng) se hizo con el kit de Boehringer basado en el método del iniciador al azar (*random priming*). Se utilizaron la mitad de las cantidades que recomienda el fabricante. La actividad específica de la sonda osciló entre $2-5 \times 10^8$ cpm/µg de DNA. La deshibridación de los filtros marcados para hibridar posteriormente con otra sonda distinta se hizo sumergiéndolos en agua hirviendo durante 10 minutos. La desaparición del marcaje se comprobó con una autorradiografía de control.

2) Complementación de la mutación *pyrF* de *E. coli*.

Las células competentes de *E. coli* FB1009 obtenidas por el

método del RbCl se transformaron con 1-2 ng de DNA plasmídico. Antes del plaqueo se lavaron dos veces por centrifugación (3.000×g, 5 minutos) y resuspensión en NaCl 0,9 % para minimizar el arrastre de nutrientes de medio rico (apartado 1.D de Resultados). Como control negativo de complementación se usó pUC13, y como control positivo, pFB6 (ver el apartado 1.B). Los tubos transformados con pUC13 se plaquearon en medio L con ampicilina para comprobar la frecuencia de transformación del lote de células competentes; en medio mínimo M9 suplementado como se ha indicado en el apartado 1.C, incluso con uracilo, para establecer la frecuencia de transformación en comparación con el medio anterior; y en medio M9 con todos los suplementos excepto uracilo para determinar la frecuencia de reversión o el crecimiento de fondo. Las muestras de células competentes transformadas con el plásmido pFB6 o los plásmidos problema de la serie pAV se plaquearon en medio L con ampicilina para determinar su frecuencia de transformación; y en medio mínimo M9 con todos los suplementos, salvo uracilo, para conocer la eficacia de transformación en este medio al complementar la mutación y estimar el vigor que mostraban las colonias transformadas.

3) Maxicélulas.

La expresión de la proteína codificada por el gen clonado (apartado 1.E de Resultados) se determinó en un sistema de maxicélulas con *E. coli* MC4100, basándose en el método de Sancar *et al.* [340]. Una muestra de cada cultivo de *E. coli* MC4100 transformada con el plásmido correspondiente y crecido a saturación en medio LB se usó para inocular un matraz de 100 mL con 15 mL de M9CA y 25 µg de ampicilina/mL. M9CA es el medio mínimo M9 con 2 mg de casaminoácidos (Difco)/mL [248]. El tamaño del inóculo se calculó para tener una DO₅₅₀ inicial de 0,1. Se incubó a 37 °C con agitación orbital el tiempo necesario para llegar a DO₅₅₀ de ~0,7. De cada cultivo se pasaron 5 mL a una placa Petri de 3 cm de diámetro y se irradiaron con luz

ultravioleta (lámpara Sylvania, modelo G30T8, a 20 cm de distancia) durante 1,5 minutos, homogeneizando la suspensión con una pipeta cada 15-20 segundos. Cada cultivo irradiado se pasó a un matraz de 25 mL tapado con película de aluminio y se incubó a 37 °C con agitación hasta doblar aproximadamente el valor de DO_{550} (es decir, $\sim 1,4$). Se añadió cicloserina para dejar una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se incubó con agitación suave durante 18 horas. Al día siguiente se comprobó que la DO_{550} no había aumentado o lo había hecho al doble, como máximo. Se centrifugó 1,5 mL de cada muestra en una microfuga y el poso se lavó dos veces posteriormente mediante centrifugación y resuspensión en las sales del medio M9. El poso lavado se resuspendió en 750 μL M9CA y se añadieron 25 μCi de L-(^{35}S)metionina. Se incubó 1 hora a 37 °C y a continuación se centrifugó y lavó como se ha indicado anteriormente. El último poso se resuspendió en 20 μL de sales de M9 y se añadieron 60 μL de tampón de ruptura (1 % SDS, 5 % β -mercaptoetanol, 10 % glicerina y 0,005 % azul de bromofenol). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos. A continuación se cargaron 40 μL en un gel del 10 % de poliacrilamida y 0,1 % de SDS directamente, o se congelaron a -20 °C. En este último caso, antes de la congelación se precipitaron 5 μL de cada muestra con ~ 2 mL de ácido tricloroacético en presencia de 20 μg de seroalbúmina bovina. Seguidamente se filtró a través de un filtro Whatmann GF/C, que se secó durante una noche a 60 °C. Al día siguiente se midió su actividad y se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 50.000-100.000 cpm por pocillo.

4) Secuenciación de DNA.

Los fragmentos de DNA clonados en M13 se secuenciaron por el método de Sanger [344, 345], utilizando ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP o ($\alpha^{35}\text{S}$)dATP. En este último caso empleó la DNA polimerasa modificada del bacteriófago T7 y los reactivos ya preparados que la firma USB (Cleveland, Ohio, EE.UU.) comercializa con el nombre de Sequenase[®].

2.B. Manipulación de *C. acremonium*.

1) Obtención de esporas y conservación de cepas.

En el caso de la cepa silvestre (ATCC 11550), se partió de cultivos crecidos en MDL a 28 °C y 300 rpm de agitación (incubador orbital New Brunswick, modelo G25) durante el tiempo suficiente como para que en el microscopio se pudieran observar conidios mayoritariamente (10-15 días). El cultivo se filtró a través de Calbiochem Miracloth (Behring Diagnostics, La Jolla, California), tela de visillo doble o algodón, dispuestos sobre un embudo. El filtrado, en alícuotas de 50 mL (tubos tipo Falcon), se lavó dos veces por centrifugación (3.000xg, 10 minutos) y resuspensión en NaCl 0,9 %. El último poso se resuspendió en 20 mL de una solución de 50 % (v/v) de glicerina y agua. Las suspensiones de conidios se conservaron a -20 °C en alícuotas de 5 mL.

La cepa semi-industrial C-10 (ATCC 48272) no produce conidiosporas en las condiciones empleadas en este trabajo, sino que sólo forma artrosporas. Para su conservación se hicieron réplicas sucesivas en placas de MCA o MMA que se incubaron a 28 °C en estufa durante una semana y se guardaron a 4 °C durante 2-3 meses.

Los mutantes auxótrofos obtenidos de la cepa silvestre (apartado 4 de la sección de Resultados) que retuvieron la capacidad de formar conidiosporas se conservaron en glicerina/agua como se ha señalado más arriba. Los mutantes afectados en la producción de conidiosporas se conservaron por réplicas sucesivas como se ha indicado para la cepa C-10. Se emplearon placas de MMA con los suplementos correspondientes, según se detalla en el apartado siguiente.

2) Aislamiento de mutantes auxótrofos.

Sirvieron de base textos generales [172, 267] y el protocolo concreto para el aislamiento de mutantes auxótrofos de *A. niger*

enriqueciendo por filtración [58]. Como agentes mutagénicos se emplearon luz ultravioleta (UV) o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (abreviadamente, nitrosoguanidina o NG). Se trabajó con índices de supervivencia en el rango de 1-15%. Para la selección preferente de mutantes afectados en el gen estructural de la OMPdecase se usó el ácido 5-fluororótico (FOA) [41].

En el caso de mutagenizar con UV se partió de esporas frescas o conservadas a -20°C en una solución al 50% (v/v) de glicerina y agua. Las esporas se lavaron 2 veces por centrifugación a $3.000\times g$ durante 10 minutos y posterior resuspensión en NaCl 0,9 %. Para cada ensayo de dosis frente a tiempo se usaron $1-4\times 10^9$ esporas viables resuspendidas en 3 mL de NaCl 0,9%, dispuestas en placas Petri de 3 cm de diámetro. Al no poseer un dispositivo para medir la energía de emisión por unidad de superficie, se facilitan los siguientes datos: lámpara germicida marca Sylvania, modelo G30T8, y 20 cm de distancia para la irradiación. Se tomaron muestras y se plaquearon diluciones en medio rico para conocer la viabilidad antes del tratamiento. Las placas con suspensión de esporas se irradiaron durante distintos tiempos, homogeneizando la suspensión a intervalos de 30 segundos con una pipeta automática de 1 mL. El contenido de cada placa se pasó a tubos recubiertos con película de aluminio, que se mantuvieron 1-2 horas en oscuridad para evitar fotorreversión. A continuación se tomó una muestra de cada tubo para plaquear diluciones en medio rico (MCA) y poder establecer el índice de supervivencia en relación con el título obtenido antes del tratamiento. El contenido de cada tubo se lavó con NaCl 0,9% como se señaló anteriormente y se conservó a -20°C en glicerina al 50% en agua hasta que se pudiera usar cuando la incubación de las placas permitiera establecer el índice de supervivencia (si se trataba de esporas frescas), o se usó directamente (cuando ya estaba calibrado el tratamiento y se podía predecir aproximadamente el índice de supervivencia en función del tiempo de irradiación). Los tubos con esporas

mutagenizadas (si se habían congelado, lavando como se ha indicado) se plaquearon en medio mínimo (MMA) o medio rico (MCA) con 0,25-1 mg/mL de FOA (Speciality Chemicals (SCM), Gainesville, Florida, EE.UU.; o Sigma) y 50 µg/mL de uracilo ó 0,1-3 mg/mL de uridina.

En los experimentos para obtener mutantes auxótrofos enriqueciendo por filtración, cada tubo de esporas mutagenizadas con el índice de supervivencia requerido se usó para inocular 10 mL de medio definido líquido en un matraz de 100 mL. El método se basa en que las esporas protótrofas germinan en MDL y quedan retenidas cuando tienen que pasar a través de un filtro del tamaño adecuado, mientras que las esporas auxótrofas, al no poder germinar en MDL, atraviesan el filtro. Se incubó a 28 °C con agitación orbital de 300 rpm (incubador New Brunswick, modelo G25) y se hicieron filtraciones cada 12 horas a través de Calbiochem Miracloth (Behring Diagnostics, La Jolla, California, EE.UU.). Cada filtrado se pasó a otro matraz previamente tarado para poder añadir medio fresco y compensar las pérdidas por evaporación. Después de la última filtración se plaqueó en los medios con FOA y uracilo o uridina antes mencionados o en MCA suplementado con 1 mg/mL de uridina, si se buscaban mutantes afectados en el gen de la OMPdecase; o en placas de MMA o de MCA suplementados con 250 µg/mL de arginina o de triptófano, si se buscaban mutantes bloqueados en la síntesis de alguno de estos aminoácidos.

Las colonias recuperadas de la mutagénesis se replicaron por lo menos 3 veces en MMA suplementado y sin suplementar con uridina, arginina o triptófano según los casos, para comprobar el fenotipo y para poder descartar los individuos bradítrofos después de tiempos de incubación largos (10-15 días). La caracterización de mutantes en la síntesis de pirimidinas se hizo en placas de MMA suplementadas con 200 µg/mL de ureidosuccínico, dihidroorótico, orótico o uridina; y en placas de MMA ± 0,5-1 mg/mL de FOA ± 0,1-3 mg/mL de uridina para la caracterización específica de los mutantes afectados en el gen estructural de la

OMPdecasa. La caracterización de los mutantes bloqueados en la síntesis de arginina se llevó a cabo en placas de MMA suplementadas con ornitina, citrulina o arginina en concentraciones de 250, 500 y 250 µg/mL, respectivamente.

En el caso de mutagenizar con NG se procedió de forma básicamente similar, pero se partió de $1-2 \times 10^8$ esporas viables o de germinulas de 6-12 horas de edad crecidas en MDL con 0,01% (v/v) de Tween 80. Una vez lavadas las esporas se resuspendieron en 1 mL de tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,8 o tris-succínico 50 mM pH 6,8 con concentraciones finales de NG entre 50 y 200 µg/mL. Se incubó a 28 °C y con agitación de 150 rpm durante distintos tiempos. Las soluciones con restos de NG o el material en contacto con ella se trataron con una solución de HBr al 3% en ácido acético glacial, se mantuvieron 2 horas a temperatura ambiente, se diluyeron en agua y se neutralizaron con NaOH 5M antes de su desecho o recuperación, respectivamente.

3) Obtención y transformación de protoplastos.

El protocolo seguido se basa principalmente en los desarrollados para *A. nidulans* [380] y *T. reesei* [297] con modificaciones, por lo que se detalla a continuación. Los medios y soluciones empleados se han reseñado en los apartados 1.C y 1.D.

Se partió de 5 mL de una suspensión de conidios de la cepa silvestre conservados a -20° C en una solución de glicerina y agua (v/v), lo que equivale a $\sim 10^9$ esporas viables en total. Los conidios se lavaron 2 veces con NaCl 0,9 % por centrifugación (3000×g, 10 minutos) y resuspensión del poso. El último centrifugado se resuspendió en 10 mL de MDL y estos sirvieron para inocular 90 mL de MDL en un matraz de 1 L. Se incubó a 28 °C y 350 rpm (agitador orbital New Brunswick, modelo G25) durante 22-24 horas. El micelio obtenido se filtró a vacío a través de un embudo Buchner en el que se habían colocado sobre su base filtrante 2 círculos recortados de papel Whatmann 2MM.

El micelio filtrado se lavó con 300 mL de agua desionizada

y una vez bien escurrido se recogió con una espátula y se pasó a una placa Petri previamente tarada. Se tomó 1 g de micelio escurrido (que contiene ~90 % de humedad, determinado por incubación a 60 °C hasta pesada constante) y se pasó a un matraz de 100 mL sobre el que se pusieron 10 mL de TLP. El micelio se disgregó en TLP con agitación orbital de 300 rpm (incubador New Brunswick, modelo G76) a 28 °C durante 5 minutos hasta lograr una suspensión homogénea y posteriormente se dejó incubar con agitación suave (150 rpm) para que se liberasen los protoplastos. La liberación de protoplastos se siguió por recuento de diluciones en TLP -en el que no se había incluido la enzima lítica ni la seroalbúmina bovina- en un hematocitómetro Thoma.

Para purificar los protoplastos de restos de micelio , se pasó el contenido del matraz a un tubo Corex de 50 mL con tapón de rosca y se añadieron 15 mL de TPP, con cuidado para evitar la mezcla entre ambas fases. Se centrifugó a 2000×g durante 5 minutos (rotor flotante), se eliminó la fase superior y se recogió la banda donde aparecían en mayor proporción los protoplastos voluminosos (cfr. el apartado 7 de Resultados). La banda citada (4-5 mL) se pasó a otro tubo en el que se añadieron 10 mL de STC y se centrifugó a 3000×g durante 5 minutos para lavar los protoplastos y eliminar restos de enzima lítica. Esta operación se repitió dos veces más, resuspendiendo con cuidado los centrifugados en 5 mL de STC. El último poso se resuspendió en 0,5 mL de STC y se tomó una muestra para contar diluciones (en STC) en el hematocitómetro. Se añadió el volumen necesario de STC para dejar una concentración de 10^9 protoplastos/mL. A continuación se hicieron alícuotas de 0,1 mL (10^8 protoplastos) en tubos de 5 mL.

Se tomó una muestra y se hicieron diluciones en STC para plaquear 0,1 mL mezclados con 5 mL de MRPb calentado a 48-50 °C sobre placas de MRP, con objeto de estimar la viabilidad antes del tratamiento que se hace con polietilenglicol en la transformación. Se tomó otra muestra y se hicieron diluciones en agua, que se plaquearon con asa de vidrio en MMA o MCA para

estimar la proporción de protoplastos falsos o restos de micelio viable.

Para obtener protoplastos de la cepa C-10 de *C. acremonium* se procedió de forma similar pero, al no poder disponer de suspensiones de conidiosporas, los primeros pasos fueron diferentes. El contenido de 2 placas con crecimiento en toda la superficie, incubadas a 28 °C durante una semana, se raspó y sirvió para inocular 25 mL de MDL en un matraz de 250 mL. Este matraz se incubó a 28 °C con 350 rpm de agitación durante 3-5 días, transcurridos los cuales se usaron 10 mL para inocular un matraz de 1 L con 90 mL de MDL. El contenido de este segundo matraz, tras 24 horas de incubación en las mismas condiciones, es el que sirvió para obtener el micelio por filtración. Los siguientes pasos fueron idénticos a los señalados para la cepa silvestre. El mismo método se usó para obtener protoplastos de un presunto mutante *arg-12* (que no puede sintetizar citrulina [117]) suplementando los medios con 250 µg/mL de arginina.

Para transformar los protoplastos purificados como se ha indicado, se añadieron 5-20 µg de DNA resuspendido en 10 µL de TE 10:1 (pH 8) por cada tubo con 10⁸ protoplastos en un volumen de 0,1 mL de STC. En los tubos de control sin DNA se añadieron 10 µL de TE 10:1 o no se añadió nada. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se añadieron 0,1 mL de PTC, que se mezclaron con los protoplastos con cuidado (mediante una pipeta automática) para no producir lisis ni espuma. Se incubó durante otros 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se tomó una muestra de uno o varios tubos para estimar la viabilidad del tratamiento después del tratamiento con polietilenglicol por dilución en STC y plaqueo en doble capa MRPb/MRP. A cada tubo se le añadieron 4 mL de MRPb a 48-50 °C, se mezcló por inversión y se vertió sobre una placa de MRP. Cuando fue necesario, se plaquearon muestras de 20 µL (es decir, 1/10 del volumen del tubo de transformación) por separado.

Las placas sembradas con protoplastos transformados y sus controles se incubaron durante 18-20 horas en estufa a 28 °C,

transcurridas las cuales se aplicó fleomicina D1 quelada con cobre (Fig. 9; CAYLA, Toulouse, Francia) en su superficie. La

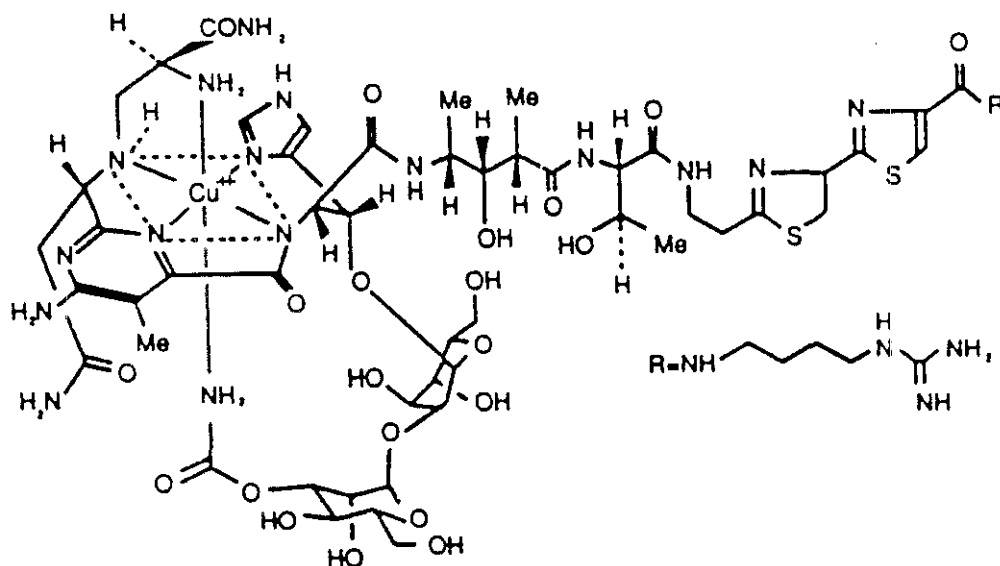


Fig. 9.- Estructura química de la fleomicina D1 quelada con cobre. La amina terminal sustituyente (R) es agmatina.

fleomicina se mantuvo disuelta en agua (1 ó 10 mg/mL) y congelada a -20°C hasta su uso. La aplicación de la capa selectiva de fleomicina se llevó a cabo de dos maneras: extendiendo primero 0,1 mL de sacarosa 1,2 M con asa de vidrio y extendiendo posteriormente los μL necesarios de la solución concentrada de fleomicina, mezclada con sacarosa 1,2 M hasta un volumen final de otros 0,1 mL; o mezclando por inversión la cantidad necesaria de solución acuosa de fleomicina con 4 mL de MRPb a $48-50^{\circ}\text{C}$ en un tubo de 5 mL y vertiéndolo sobre la placa. En cualquiera de los dos casos es importante que la superficie sobre la que se hacen las placas y se plaquea dos veces posteriormente (primero los protoplastos, luego la fleomicina) sea lo más horizontal posible. En caso contrario se forma un gradiente de protoplastos o de concentración de fleomicina que produce condiciones no homogéneas en la superficie de la placa, lo que lleva a resultados inconsistentes.

4) Extracción de DNA.

Se siguió el método usado con *A. nidulans* en nuestro laboratorio. Se partió de micelio crecido en MDL y recogido por filtración a vacío sobre papel de filtro estéril. Se hicieron alícuotas de 0,5 g de peso escurrido que se pasaron a tubos tipo Falcon. Cada alícuota se congeló en mezcla hielo seco/acetona y se liofilizó. El liófilo se machacó con una varilla de vidrio hasta lograr un polvo de consistencia muy fina. El polvo se resuspendió en 10 mL de una solución compuesta por 10 mM HEPES (ácido (2-hidroxietil)-1-piperín etanosulfónico; pH 6,9 con NaOH), 0,5 M sacarosa y 20 mM EDTA. Se añadió 1 mL de SDS al 10 % (p/v) y se mezcló suavemente por inversión del tubo. La muestra se incubó a 65 °C durante 15 minutos. A continuación se añadieron 10 mL de TE 50:20 (50 mM de Tris-HCl, pH 8 y 20 mM de EDTA) y se mezcló por inversión. Seguidamente se añadió un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (49:49:2, en volúmenes) y el tubo se mezcló por inversión durante 5 minutos. La fase acuosa se separó por centrifugación a 2.000xg durante 10 minutos y se pasó a un tubo limpio. La fenolización se repitió de idéntica forma dos veces más. La última fase acuosa se precipitó a temperatura ambiente durante media hora con 0,6 volúmenes de isopropanol y acetato sódico pH 6 en concentración final 0,3 M. El precipitado se centrifugó en las condiciones antedichas, se lavó con etanol al 70 % en agua (v/v) y se secó a vacío. El poso se resuspendió en 2 mL de TE 10:1 (pH 8) y se añadió RNasa A para dejar una concentración final de 50 µg/mL. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. El DNA se precipitó con isopropanol y acetato sódico como se ha señalado más arriba y se centrifugó y lavó del mismo modo. El último poso se resuspendió en 0,5 mL de TE 10:1 y se conservó a 4 °C ó a -20°C. Para las digestiones se emplearon 10 unidades de enzima de restricción/µg DNA.

2.C. PROGRAMAS INFORMATICOS.

El análisis de secuencias de DNA y proteínas se hizo con el paquete de programas PC/Gene, versión 6.50 (Dr. A. Bairoch, Universidad de Ginebra, Suiza).

III. RESULTADOS

1. CLONACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE *C. acremonium* QUE CODIFICA PARA LA OROTIDINA 5'-MONOFOSFATO DESCARBOLILASA (=OMPDECASA).

1.A. Hibridación heteróloga del DNA genómico.

Se hizo una hibridación de distintos digeridos del DNA de *C. acremonium* inmovilizados en nitrocelulosa con el gen *pyr-4* de *N. crassa* marcado radiactivamente. Con ello se pretendía saber si existían secuencias únicas en el genoma de *C. acremonium* que hibridasen con el gen citado, así como establecer las condiciones para el sondeo posterior de una genoteca (cfr. el apartado 2.A de Materiales y Métodos).

El plásmido pFB6 contiene el gen *pyr-4* de *N. crassa* en un inserto de ~4,2 kb [21, 57]. Con objeto de eliminar las zonas flanqueantes sin información estructural y poder mejorar así el resultado de la hibridación, se construyó el plásmido pNc*pyr4*, que es el que se utilizó como sonda. Para ello se aisló el fragmento *PvuII*-*BglIII* de ~1,8 kb perteneciente a pFB6 -que contiene la región codificante completa del gen *pyr-4* de *N. crassa* [21, 279]- y se clonó en los sitios *SmaI* y *BamHI* del vector pUC18.

La hibridación del DNA de *C. acremonium* frente al inserto del plásmido pNc*pyr4* marcado radiactivamente muestra que aparece una sola banda iluminada en cada una de las tres digestiones (Fig. 10). Estas bandas podrían contener el gen estructural para la OMPdecase de *C. acremonium*.

1.B. Sondeo de una genoteca.

Con el fin de clonar la región de DNA que hibridaba con el gen de *N. crassa* y de este modo poder amplificarla para su estudio y uso posterior, se sondeó una genoteca de *C. acremonium*

RESULTADOS

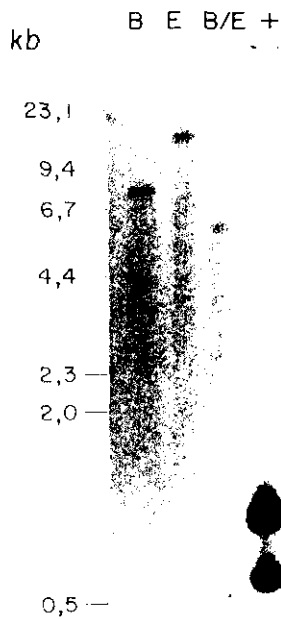


Fig. 10.- Hibridación del DNA total de *C. acremonium* con el gen *pyr-4* de *N. crassa*. En cada carril se cargaron 5 μ g de DNA fúngico digeridos con *Bam*HI, *Eco*RI o ambas, según se indica por la letra inicial de cada enzima. Como control positivo (carril +) se puso 1 ng de pNc π yr4 digerido con *Eco*RI y *Hind*III. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 0.8% en TAE, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y éste se hibridó con el inserto del plásmido pNc π yr4 marcado radiactivamente con P^{32} . Obsérvese que la sonda ilumina un fragmento *Bam*HI de ~8,5 kb, un fragmento *Eco*RI de ~14 kb un fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de ~6,2 kb.

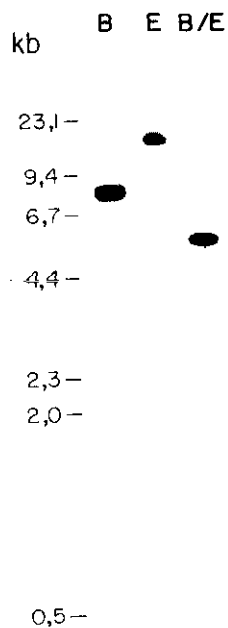


Fig. 11.- Hibridación del DNA de λ Capyr4 con el gen *pyr-4* de *N. crassa*. El análisis es similar al de la Figura 10.

previamente construida en λ EMBL4 [291, 292]. Se usaron las mismas condiciones de hibridación que en apartado anterior. Se plaquearon ~20.000 fagos recombinantes, lo que equivale aproximadamente a tener representados 3 genomas con una probabilidad del 99% de encontrar por lo menos una vez un fago con la secuencia buscada [80], considerando un inserto medio en los fagos recombinantes de 16 kb [291] y un tamaño del genoma para *C. acremonium* de 22.500 kb [358]. Después de tres rondas de purificación se aisló un fago puro al que se denominó λ Capyr4.

El DNA de este fago digerido con las mismas enzimas e hibridado en las condiciones precedentes mostraba un patrón de bandas positivas a la sonda idéntico al obtenido en la hibridación del DNA genómico (Fig. 11), lo que indicaba que se había clonado entera la zona genómica buscada. En todas las digestiones aparecían bandas más pequeñas pertenecientes al inserto de λ Capyr4 que no se iluminaban con la sonda (no se muestra). La digestión con *Bam*HI liberaba los brazos del vector λ EMBL4. Este hecho significaba que, aunque la genoteca se había construido clonando fragmentos parcialmente digeridos con *Sau*3A, se habían reconstituido los dos sitios *Bam*HI, lo que ocurre en un 25% de los casos en cada extremo.

1.C. Subclonación y mapeo.

Se aislaron los fragmentos *Bam*HI de ~8,5 kb y *Bam*HI-*Eco*RI de ~6,2 kb partir del inserto de λ Capyr4 y se clonaron en pUC13, dando lugar a los plásmidos pAV1 y pAV2, respectivamente. Estos plásmidos seguían siendo positivos frente al inserto de pNcpyr4 en experimentos de hibridación en colonia. Ambos plásmidos se mapearon con enzimas de restricción para poder caracterizar la parte clonada del genoma (Fig. 12). De este modo se podría subclonar y reducir al mínimo la zona de interés.

Debe mencionarse que en el plásmido pAV2, aunque no en el pAV1, aparecía un corte con *Bam*HI refractario a la digestión, que

RESULTADOS

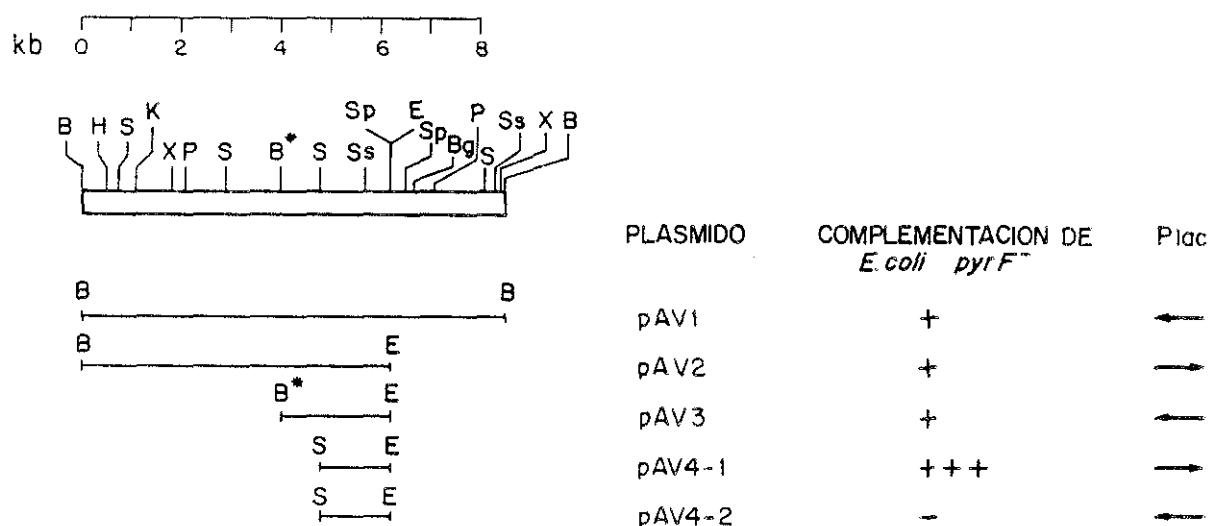


Fig. 12.- Mapa de restricción y análisis funcional del fragmento BamHI de 8,5 kb perteneciente a *C. acremonium* que hibrida con el gen *pyr-4* de *N. crassa*. Explicación en el texto. Abreviaturas: B= BamHI; B*= XhoII; Bq= BglII; E= EcoRI; H= HindIII; K= KpnI; P= PstI; S= SalI; Sp= SphI; Ss= SstI; X= XhoI.

siempre resultaba parcial. Este sitio BamHI hiposensible resultó muy útil para subclonar el gen y construir pAV3 (Fig. 12), en virtud también de la complementación de la auxotrofia *pyrF* de *E. coli* (ver el apartado siguiente). La secuencia posterior mostró que se trataba de un sitio XhoII (GGATCT) en lugar de BamHI (GGATCC; ver, más adelante, la Fig. 17).

1.D. Complementación de la mutación *pyrF* de *E. coli*.

Los plásmidos pAV1 y pAV2 se usaron para transformar la cepa FB1009 de *E. coli*, que es deficiente en la actividad OMPdecase (*pyrF*; [20]). Como control positivo de complementación se usó el plásmido pFB6 y como control negativo, el vector pUC13. No se detectó reversión de FB1009 (transformada con pUC13 y plaqueada en medio mínimo con ampicilina, suplementado con todos los

requerimientos de la cepa salvo uracilo) en el rango de cifras manejado (hasta 1/60.000). Se observó, no obstante, cierto crecimiento de fondo. Este hecho puede deberse al tiempo de incubación de las placas (3-4 días); a los nutrientes que puedan quedar dentro de las células por su crecimiento en medio rico para hacerlas competentes; y al tiempo de recuperación en medio rico después de transformadas y antes de su plaqueo, a pesar de los lavados llevados a cabo (cfr. el apartado 2.A de la sección de Materiales y Métodos).

Tanto con pAV1 como con pAV2 se obtuvieron bacterias resistentes a ampicilina en el medio mínimo citado (Fig. 12), aunque siempre con menor vigor en comparación con las transformadas con pFB6. Este resultado demuestra que en el DNA clonado de *C. acremonium* de ambos plásmidos existía una secuencia capaz de codificar una OMPdecase funcional. Este hecho, junto con el conocimiento del mapa físico previamente establecido, permitió subclonar el inserto de los plásmidos pAV1 y pAV2 mediante análisis funcional de la complementación de la mutación *pyrF* (Fig. 12).

El plásmido pAV1 alberga el DNA de *C. acremonium* en la misma orientación que el promotor *lac* de pUC13 y el plásmido pAV2, en sentido contrario (Fig. 12). Por tanto, debe concluirse que la expresión del gen fúngico en la bacteria no ocurre por medio de señales del vector procariota. La explicación más plausible es que en el DNA de *C. acremonium* deben existir secuencias que simulan las señales propias de expresión de *E. coli*.

Aprovechando el sitio *Bam*HI hiposensible se construyó el plásmido pAV3, con un inserto *Bam*HI*-*Eco*RI de ~2,2 kb, que también complementaba la mutación *pyrF*. La digestión de pAV3 con *Sal*I y *Eco*RI dividía el inserto de este plásmido en dos fragmentos, de ~0,8 kb y ~1,4 kb (Fig. 12). Debe hacerse notar que uno de los dos sitios *Sal*I (el más alejado del corte *Eco*RI) no pertenece al genoma de *C. acremonium*, sino que procede de los sitios únicos de clonación de pUC13. Para saber en qué dirección se transcribía el gen clonado en pAV3 se construyeron los plás-

RESULTADOS

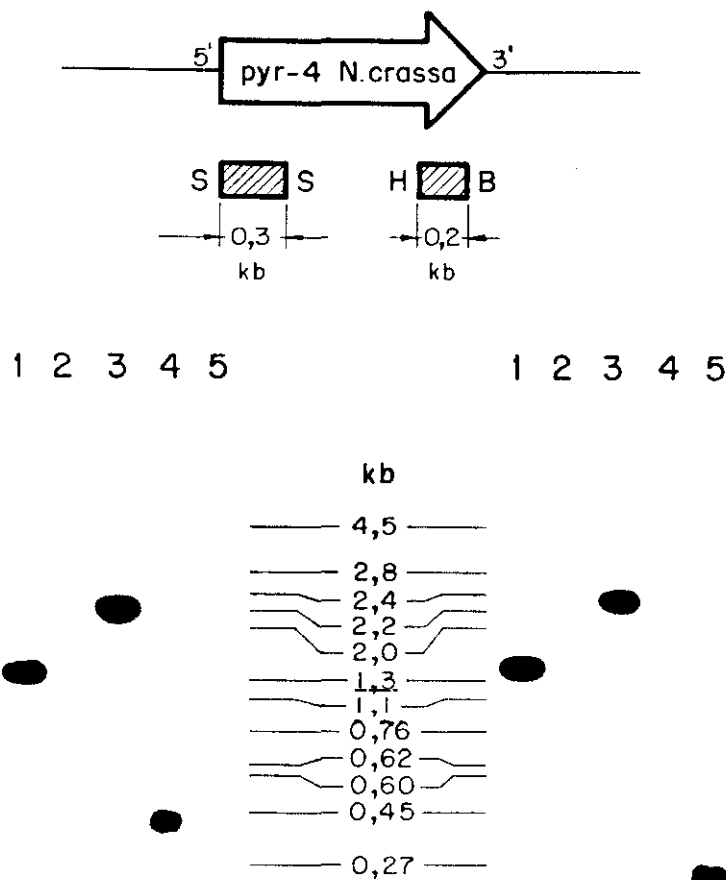


Fig. 13.- Dirección de transcripción del gen clonado. En la parte superior se esquematizan, a escala, las sondas correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen *pyr-4* de *N. crassa*. Los paneles inferiores son autorradiografías de filtros hibridados con la sonda 5' (izquierda) o con la sonda 3' (derecha). Ambos geles se corrieron paralelamente y en agarosa al 1% en TAE. La disposición de los pocillos es idéntica.

Carril 1: 200 ng de fragmento *SalI*-*EcoRI* de 1,4 kb perteneciente a pAV3 (ver la Fig. 12).

Carril 2: 200 ng de fragmento *BamHI**-*SalI* de 0,8 kb (obtenido por digestión de pAV3 con *SalI* aprovechando la disposición de los sitios únicos en pUC13, por lo que realmente es un fragmento *SalI* en ambos extremos).

Carril 3: 200 ng del inserto completo de pAV3 (obtenido por digestión con *PstI* y *EcoRI*).

Carril 4: 50 ng de pNc5pyr4 digeridos con *SalI* (5 ng de inserto como control positivo de la sonda para el extremo 5').

Carril 5: 50 ng de pNc3pyr4 digeridos con *HindIII* y *BamHI* (5 ng de inserto como control positivo de la sonda para el extremo 3').

midos pNc5pyr4 y pNc3pyr4, con el fin de usarlos como sondas. El plásmido pNc5pyr4 lleva un inserto *SalI* de ~0,3 kb que corresponde a la zona 5' del gen *pyr-4* de *N. crassa*. El plásmido pNc3pyr4 lleva un inserto *HindIII-BamHI* de ~0,2 kb que corresponde a la zona 3' del gen de *N. crassa*. Ambos plásmidos están clonados en pUC13 (Fig. 13). El análisis por el método de Southern frente a las sondas de los extremos 5' y 3' del gen de *N. crassa* mostraba todo el marcaje en el fragmento mayor (Fig. 13), resultado que no permitía establecer la dirección de transcripción y que sugería que todo el gen se encontraba en el fragmento *SalI-EcoRI* de 1,4 kb.

Sin embargo, cuando el fragmento *SalI-EcoRI* de 1,4 kb se clonó en pUC13 para construir el plásmido pAV4-1, se obtuvo complementación, y cuando se clonó en pUC12 para obtener pAV4-2, no se obtuvo complementación. Las colonias de *E. coli* FB1009 transformadas con pAV4-1 eran más vigorosas que los demás plásmidos de la serie pAV (Fig. 12). Estos resultados podían interpretarse como que los plásmidos pAV4-1 y pAV4-2 llevaban insertado casi todo el gen de *C. acremonium*, pero que les faltaba la zona correspondiente al extremo amino de la proteína; y que el extremo 5' del gen de *N. crassa* era poco homólogo con relación al de *C. acremonium*. Si se lograba una buena expresión en *E. coli*, podía ser debido a una fusión traduccional entre los primeros tripletes correspondientes al péptido α del gen *lacZ'* de pUC13 y el gen de *C. acremonium*. Esta suposición se pudo comprobar posteriormente con la secuencia de nucleótidos del gen, estableciéndose que en pAV4-1 se sustituyen los 8 primeros tripletes del gen de *C. acremonium* por los 10 primeros tripletes del gen *lacZ'* de pUC13 (Fig. 14); y que los 8 primeros codones del gen clonado, como toda la zona promotora, son poco homólogos -en conjunto- con las secuencias equivalentes de *N. crassa*. Con ello se demuestra que los aminoácidos de la zona aminoterminal no son imprescindibles para la actividad OMPdecase. De hecho, el extremo amino está poco conservado en el conjunto de otras OMPdecasas conocidas (ver, más adelante, el apartado 3.A).

PstI

HindIII Sall

ATG.ACC.ATG.ATT.ACG.CCA.AGC.TTG.GGC.TGC.AGG.tcg.aca.tat.tca.aca.cgg ...
fMet Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Gly Cys Arg Ser Thr Tyr Ser Thr Arg ...

9 10 11 12 13 14

Fig. 14.- Fusión traduccional producida en pAV4-1 entre los primeros tripletes correspondientes al péptido α de la β -galactosidasa de pUC13 y el gen clonado de *C. acremonium*. Con letras mayúsculas se señala el DNA de *E. coli* y con letras minúsculas el DNA fúngico. El número de los aminoácidos corresponde con la posición que ocupan en la proteína íntegra deducida por la secuencia de nucleótidos (ver la Fig. 17).

1.E. Presencia y tamaño del producto que codifica el DNA clonado.

Para saber si existía un polipéptido codificado por los plásmidos de la serie pAV que fuera responsable de la complementación de la mutación *pyrF*, se hizo un análisis de las proteínas codificadas por estos plásmidos en la cepa de maxicélulas *E. coli* MC4100. Tal polipéptido debería tener una masa molecular relativa comparable a la descrita para *S. cerevisiae* (27 kDa [50, 329]) o a la deducida por la secuencia de nucleótidos en *N. crassa* (44 kDa [279]). En la Figura 15 se muestra que no aparecen proteínas sintetizadas en la cepa sin transformar y que en la cepa transformada con el vector pUC13 aparece una banda con una movilidad correspondiente a la masa molecular de la β -lactamasa. Cuando se analizan maxicélulas transformadas con plásmidos representativos de la serie pAV se observa que aparece una segunda banda con una movilidad similar a la de una proteína de ~46 kDa. La relación entre este polipéptido y la complementación de la mutación *pyrF* apoya la idea de que los plásmidos pAV contenían el gen estructural para la OMPdecase de *C. acremonium*. No se logró establecer la presencia del producto génico de *N. crassa*.

El péptido codificado por los plásmidos pAV1 o pAV4-1 muestra un tamaño similar. Este hecho confirmaba el que se

produjera la fusión traduccional antes citada (Fig. 14); y es coherente con que el número de aminoácidos sustituidos en la zona N-terminal de la OMPdecasea de *C. acremonium* en pAV4-1 daba lugar a una proteína híbrida de tamaño comparable a la original.

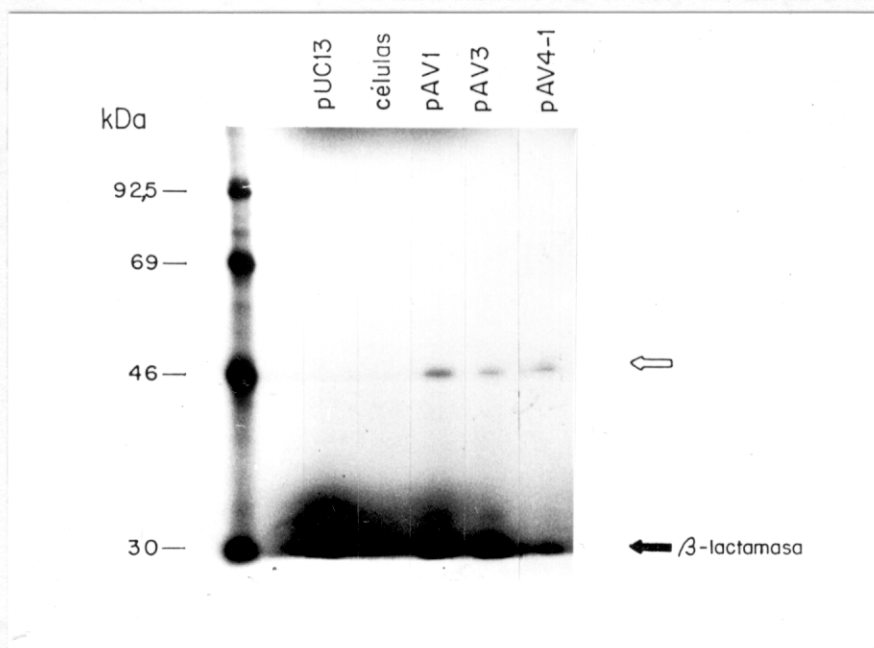


Fig. 15.- Análisis de la proteína codificada por plásmidos representativos de la serie pAV en un sistema de maxicélulas. Las flechas señalan la posición de la β -lactamasa y del polipéptido codificado por el DNA clonado de *C. acremonium*.

2. SECUENCIA DEL GEN CLONADO Y LAS ZONAS FLANQUEANTES.

Los resultados anteriores permitían concluir que se había clonado el gen estructural para la OMPdecasea de *C. acremonium*. Para poder caracterizar el gen clonado a nivel molecular se secuenció todo el inserto del plásmido pAV3. De este modo se podrían distinguir con exactitud las zonas promotora, estructural y terminadora. Además, se podría comparar la proteína codificada con las OMPdecasas de otras especies.

RESULTADOS

La secuencia de nucleótidos se determinó en ambas bandas y a través de todos los sitios de restricción que sirvieron para subclonar el inserto de pAV3, de manera que se pudiera establecer sin error. Los fragmentos principales en los que se dividió esta zona para subclonarlos en fagos de la serie M13, así como la estrategia seguida para secuenciarlos, se presentan en la Figura 16.

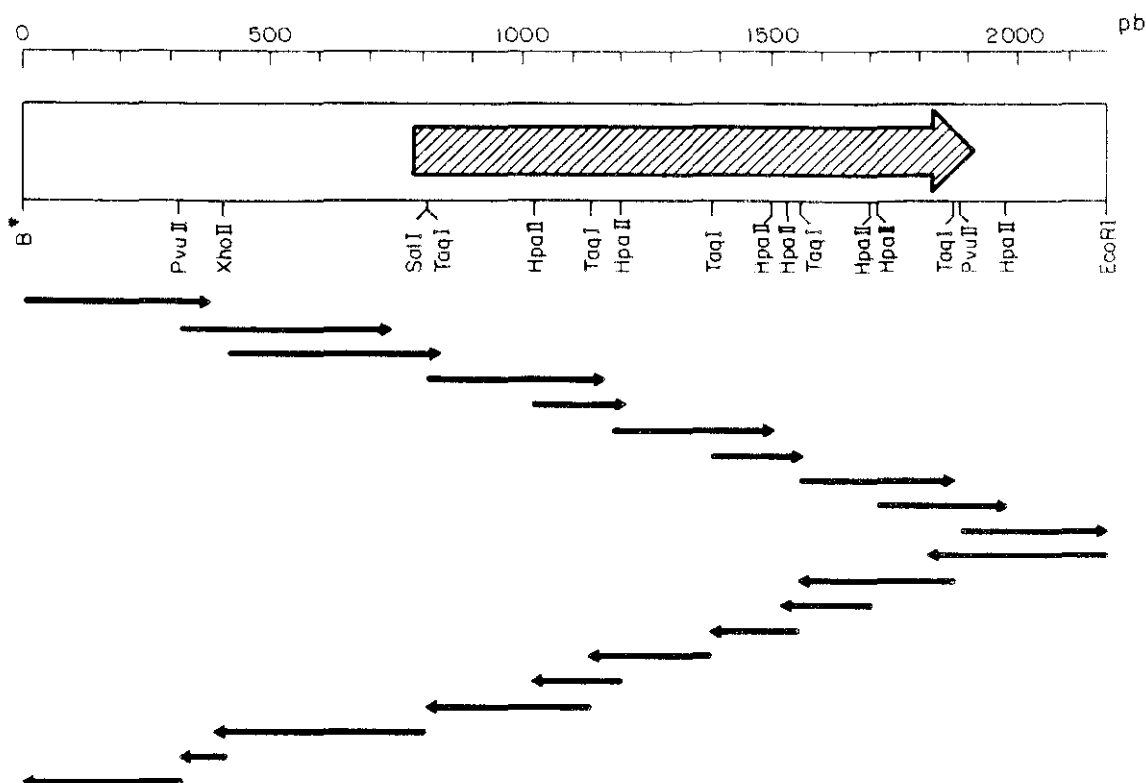


Fig. 16.- Estrategia seguida para la secuenciación del inserto de pAV3. Sólo se muestran los sitios de restricción usados para subclonar en fagos de la serie M13 y los clones principales. Las flechas pequeñas indican el sentido de lectura de las autorradiografías. La caja grande representa el inserto de pAV3 y la flecha grande la posición y orientación del gen. Toda la figura está hecha a escala. Abreviaturas: B* = XhoII; E = EcoRI; H = HpaII; P = PvuII; S = SalI; T = TaqI; X = XhoII.

La secuencia del inserto de pAV3 está formada por 2176 pb (Fig. 17). Mediante análisis por ordenador se puede concluir que existe una secuencia de lectura abierta de 1131 pb -incluyendo el codón de terminación ópalo- que va en dirección del sitio

*Bam*HI hiposensible hacia el sitio *Eco*RI (Fig. 16). Está flanqueada en el extremo 5' por 780 pb y en la zona 3' por 265 pb. El % de G+C en la zona flanqueante en 5' es del 54,9, en la secuencia de lectura abierta del 61,2 y en la zona flanqueante en 3' del 45,5. El contenido en G+C global del inserto de pAV3 es del 56,8%.

2.A. Gen estructural.

El ATG en posición 781 de la Figura 17 debe ser el codón iniciador de la traducción por tres motivos: 1) En esa pauta de lectura no hay ningún otro codón ATG en los 780 pb anteriores al mismo; 2) Su entorno (CATCatgGC) es coherente con el consenso establecido para hongos filamentosos ($CA^c_{\lambda}atgGC$) [23, 153]; 3) La zona aminoterminal del polipéptido muestra gran homología con la proteína correspondiente de *T. reesei* -un organismo filogenéticamente próximo, como se verá en el apartado 3-, en donde los 8 primeros aminoácidos son idénticos [36, 367]. Del mismo modo, el codón TGA de fin de traducción en posición 1909 de la Figura 17 también se corresponde una zona de relativa homología en los polipéptidos de otras OMPdecasas conocidas (cfr. las referencias de la Tabla 2). La secuencia de lectura abierta establecida codifica para una proteína de 376 aminoácidos con un peso molecular deducido de 41.128 g/mol.

El uso de codones muestra un sesgo hacia tripletes terminados en C (41,3%) o en G (38,1%), en parte debido al contenido en G+C del gen (Tabla 1). Esta tendencia es general en los genes de hongos filamentosos [23, 153, 322]. En el gen clonado no se usa el codón ATA para ninguna de las 15 isoleucinas presentes en la proteína, ni el GTA (26 valinas), ni el TCT (21 serinas), ni el AAA (32 lisinas), ni el CGT o AGA (19 argininas). Un sesgo similar, aunque menos pronunciado, puede deducirse a partir de la secuencia publicada del gen estructural que codifica para la proteasa alcalina de *C. acremonium* [184] (no se muestra).

RESULTADOS

```

1  GGATCTGCCGTCGCCGATCCACCCGAGTGTCCGCCGCCGCGACCCCTACTATTAGGCTACTAACTGCTCAGGATGGCAAGCGGGCAAAATAGGCAACGGCATATTATCCCAATCGGGGT
121  TGTCCCTACTACCGCATTAACCCCTGCATCTCAGATGGCATAATAGCTCTTGCAACCTTTCTGGGCGTTGACTGACACCCCTTCGCCCGACAGATTCGGCGCTTAATACAGCACAGCC
    ***                                     ***
241  TTCCTGTGGCTGTATCCCGTACCTTCCCTTCCTCGCACATACATGAAAAGATTMTTCCAGCACGCCAACAGCTGTACACCTGTCTGTCTGGCGGCTTTTCTCGGTCTGTCACCGCTT
361  CCACCTACTTTCTATGACTCCGAGTCCGCTGGCTCCCTAAATPACCCCGGATCTTGGCCCCCTTCGCGTGTCTGTCTGCCCGGATCTTGAGCGCTTACTTAAACCCCTCGGCAATCCA
    ***
481  GGTGTGAGTACCAATCTTGATCCGGAACGGAACACATACAGTGCATTGCCCGCCCGATCAATTTGGATTGAGTTTGGGACTTGACACATTTGGGACCACTTCTCACTGTGTGATCTACCG
    >>>> <<<<<
601  ACCGCTCCTTTACCGCGATCAAGCGCGCTCAATCACTTCGCTCTGTCTGATCTGTCTACCCCTCCACTTCTGTTCAGGCAGGTTACAGAGTTACCCCGTGTTCCTCTGTGGAAGCAGC
    >>>> <<<<<< <<<<<<
721  GGCGAGAACGCTGAAGAAAAATCAAAAAATCCAGCGCAGTCTGTGATAATCCTTTCATCATGGGCCACATCCGACTCTCAAGTCGACATATTCAACACGGGCCGAGACGGTCAACAT
    >> <<<<<< M A P H P T L K S T Y S T R A E T V T H
841  CCTCTCAGTGCATACCTCTACAAGCTCATGGACCTCAAGCGCTCCAACTCTGCTGAGCGCGGATGTCGCCAACGCCCGGAGCTGCTGACCTCGCCGACAAGGTTGCTCCCTCCATC
    P L S A Y L Y K L M D L K A S N L C L S A D V A N A R E L L H V A D K V G P S I
961  GTCGTCTCAAGACCCACTACGACATGCTGGCGCGCTGGGACTTTACGCCCGAGAGCGGGCACCGGGGCAAGGTTGGCCAAAGCTGGCTCGCAAGCACGGCTTCTCATCTTTGAGGACCGC
    V V L K T H Y D M V A G W D F T P E T G T G A R L A K L A R K H G P L I F E D R
1081  AAGTTTGGCGATATTGGAATACGGTGGAGCTACAGTACACTCAAGGAGCGCGCGCATCATCGAGTGGGCACACATGTCAATGTCAACATGGTCCCGGCAAGCGCTCGGTGACGCTG
    K P G D I G N T V E L Q Y T Q G A A R I I E W A H I V N V N M V P G K A S V T S
1201  CTCGCCAACCGCAGCGCCAAAGTGGCTTGAGCGATTACCGTATGAGGTCAAGACTTTCGGTACGGTTGGCAGCGCCCGAAACACAGACGAGGACGATGATGACGAGGACGATGSCAATGCT
    L A N A A A K W L E R L P Y E V K T S V T V G T P R N T D E D D D D E D D D G N A
1321  GGAGAGATGGAGCGCAGCCACACTTCGGCTTGAAACGGCAACAAACGGCGTCCCATCAAGGAATCGAGTGAACGGCGCAAGGGCAGCATCTCTCCGTACGACAGTACCCAGCAGTAC
    G E M E R S H T P G L N G N N G V P I K E S S D G R K G S I V S V T T V T Q Q Y
1441  GAGTCAGCCCACTACCGCGGTTGACCAAGACGATTGCGGAGGAGGGTGACATGCTCTCGCGGCTGTCGAGGAGCGCGCCCTGAACCGGGGCTCTCATCTCGGCGAGATGTCGAGC
    E S A H S P R L T K T I A E E G D M L L A G L E E P P L N R G L L I L A Q M S S
1561  GCGGCAACTTTCATGAACGACAGTACACCGAGCGCTGCTGGAGGGCGGCGAGGGAACACAAGGACTTTGTCTGGGCTTCTGTCTGCGAGGAGCGCTCAACTCGCAGCGACGACGAC
    A G N F M N A E Y T Q A C V E A A R E H K D F V M G P V S Q E A L N S Q P D D D
1681  TTCATCCACATGACGCCCGGCTGCCAGCTGCCCGCGGAGCAGGAGGAGCGCGAGCTCAGGGCGATGGGAAGGGCCAGCAGTACAACACCCCGAGAAGCTCATTGGTGTGTGTGGT
    F I H M T P G C Q L P P R H E E D A E L R G D G K G Q Q Y N T P E K L I G V C G
1801  GCGGATATCGTCTATCTCGGAGGGGATTCTGAAGGCTGGCGACTTGCAGCATGAACGGAGCGGTATCGATCAGCTGCCTGGAAGGCATACACTGAGAGGGTTGATGAGTTGGGGG
    A D I V I V G R G I L K A G D L Q H E A E R Y R S A A W K A Y T E R R V R ***
1921  TGGGCGAAGAGGATGGGAGGTTATTGGCACGAGCTTCGAGGGCAGCGGATGGTAGATATCCAACTATTTCCTCCATACGCTTTTCAAAATACCATACAGCTACCTAACGTTAGTTGG
    ***
2041  ATGGACAAAGCTGTCTCGGATAGAAAAGAGGGAAGGATTACAGGCGTGAGTTATTCTGTGTCTATGGCCACTATGGAATCCGTGTAAAGGAAGCGCATGCTATTAAATTATGCAAAAACA
    ***
2161  GGACACCCCTGGAATTC
    ***

```

Fig. 17.- Secuencia nucleotídica del inserto del plásmido pAV3 y secuencia deducida de aminoácidos para la OMPdeca de *C. acremonium*. Los motivos señalados en las zonas flanqueantes se discuten en el texto.

Este uso preferente de codones debe considerarse como propio de un gen con expresión media en *C. acremonium*, por analogía a como se considera en los genes correspondientes *pyr-4* de *N. crassa* [153] y *pyrG* de *A. nidulans* [238], y como está establecido para el equivalente *URA3* de *S. cerevisiae* [201].

SECUENCIA DEL GEN

TTT Phe	4	-	TCT Ser	0	-	TAT Tyr	3	-	TGT Cys	1
TTT Phe	5	-	TCC Ser	3	-	TAC Tyr	8	-	TGC Cys	3
TTA Leu	1	-	TCA Ser	4	-	TAA ***	0	-	TGA ***	1
TTG Leu	4	-	TCG Ser	8	-	TAG ***	0	-	TGG Trp	4
CTT Leu	1	-	CCT Pro	1	-	CAT His	3	-	CGT Arg	0
CTC Leu	16	-	CCC Pro	8	-	CAC His	9	-	CGC Arg	6
CTA Leu	1	-	CCA Pro	2	-	CAA Gln	1	-	CGA Arg	4
CTG Leu	9	-	CCG Pro	6	-	CAG Gln	11	-	CGG Arg	4
ATT Ile	5	-	ACT Thr	4	-	AAT Asn	3	-	AGT Ser	2
ATC Ile	5	-	ACC Thr	6	-	AAC Asn	13	-	AGC Ser	4
ATA Ile	0	-	ACA Thr	5	-	AAA Lys	0	-	AGA Arg	0
ATG Met	10	-	ACG Thr	11	-	AAG Lys	19	-	AGG Arg	5
GTT Val	3	-	GCT Ala	4	-	GAT Asp	7	-	GGT Gly	5
GTC Val	14	-	GCC Ala	16	-	GAC Asp	17	-	GGC Gly	18
GTA Val	0	-	GCA Ala	6	-	GAA Glu	3	-	GGA Gly	3
GTG Val	9	-	GCG Ala	12	-	GAG Glu	27	-	GGG Gly	5

Tabla 1.- Uso de codones del gen estructural para la OMPdecase de *C. acremonium*, expresado en frecuencia absoluta de aparición de cada triplete.

2.B. Promotor.

En los 780 pb anteriores al codón iniciador de la traducción existen otros cuatro tripletes ATG en distinto marco de lectura. Aparecen pautas abiertas entre las posiciones 74-189, 156-161, y 284 (ó 374) y 396 (Fig. 17). Estas secuencias de lectura se cierran como mínimo a ~380 pb del ATG iniciador. Por tanto, es poco probable que el gen clonado de *C. acremonium* esté sujeto a regulación traduccional mediante un mecanismo de atrapamiento de ribosomas.

No aparecen señales asimilables a las cajas -35, -10 y sitio de unión al ribosoma típicas de procariotas. Hay que señalar que en el gen *URA3* de *S. cerevisiae* sí existen señales suficientes para la expresión en *E. coli* [329]. Asimismo, en el gen *pyr-4* de *N. crassa* se encuentra una señal comparable a la caja de Shine-Dalgarno [279] y el inicio de transcripción tiene lugar en la misma base tanto en el hospedador homólogo como en *E. coli* [137]. La ausencia de señales asimilables a las señales propias de procariotas en el gen clonado apoya el resultado obtenido en la complementación de *E. coli* FB1009 con pFB6 o pAV4-1 en comparación con los demás plásmidos de la serie pAV.

RESULTADOS

No aparece una caja TATA típica, fenómeno que es frecuente en hongos filamentosos [23, 153, 322]. Aparecen, en cambio, varias cajas del tipo CAAT (posiciones 86, 110, 492 y 631; Fig. 17). La más indicada para tener cierto significado es la que empieza en la posición 631, es decir, a 150 pb del triplete iniciador de traducción. El entorno de esta secuencia (CCGTcaatCACTT) es comparable al de la caja descrita en el *pyr-4* de *N. crassa* (CCGGcaatTCTT), en donde se sabe que esta zona - situada a 127 pb del inicio de transcripción y a 183 pb del ATG- es esencial para la expresión [137].

A continuación de la presunta caja CAAT del gen clonado de *C. acremonium* hay varios motivos que merecen señalarse:

1) Dos zonas ricas en CT (aproximadamente un 80%) en las posiciones 656-674 (106-124 del ATG) y 693-712 (68-87 del ATG). La segunda zona rica en CT se corresponde con una región más amplia (25 pb) y con un contenido del 100% de CT en el promotor del gen *pyr-4* de *T. reesei* [36, 367]. Las zonas ricas en CT suelen encontrarse en o inmediatamente antes del inicio de transcripción en los genes de hongos [cfr., p.ej., 159, 273, 313, 406], incluso en *C. acremonium* [255, 362].

2) A 12 pb de la última zona señalada aparece la secuencia CAGAAC, que termina a 51 pb del ATG. El mismo hexanucleótido y a la misma distancia del inicio de traducción se encuentra en el gen *cefEF* de *C. acremonium* [339].

3) En las posiciones 735-751 (a 29-46 pb del ATG), 14 nucleótidos de los 17 que forman la secuencia son de adenina (84%). Esta secuencia podría producir curvatura en el DNA, bien por sí sola o por la unión con una proteína [158, 162].

4) Detrás de esta zona rica en A aparece el motivo CCAGCC, cuya última base se sitúa a 22 pb del ATG. Esta secuencia es idéntica a la que se encuentra a 31 pb del ATG en el promotor del gen *pyr-4* de *T. reesei* [36, 367] y algo similar al motivo aCatCC presente a 26 pb del ATG en el promotor del gen *pyr-4* de *N. crassa* [137, 279].

Se encuentran varias secuencias inversas y repetidas que dan

SECUENCIA DEL GEN

lugar a horquillas y que podrían ser sitio de unión o de reconocimiento de proteínas implicadas en la transcripción o su regulación [372]. Por su situación y valor de energía libre (calculada con el programa HAIRPIN de PC/Gene), destacan las siguientes (Figs. 17 y 18):

1) La centrada en las posiciones 621-622 (antes de la caja CAAT; -10,6 Kcal/mol), en cuyo bucle aparece el tetranucleótido CAAG. Muchos genes de hongos tienen el inicio de transcripción en la secuencia YAAG (Y = pirimidina) [153].

2) La centrada en la posición 708 (al final de la segunda zona rica en CT; -6,6 Kcal/mol).

3) La centrada entre las posiciones 725-726 (relacionada con la caja CAGACC común a los promotores del gen clonado y del gen *cefEF* de *C. acremonium*; -10,8 Kcal/mol).

Las horquillas segunda y tercera solapan en 2 pb, por lo que podrían formar una estructura más compleja.

No se encontraron otros motivos comunes con promotores de otros genes estructurales de OMPdecasas ni con otros promotores de genes de *C. acremonium*.

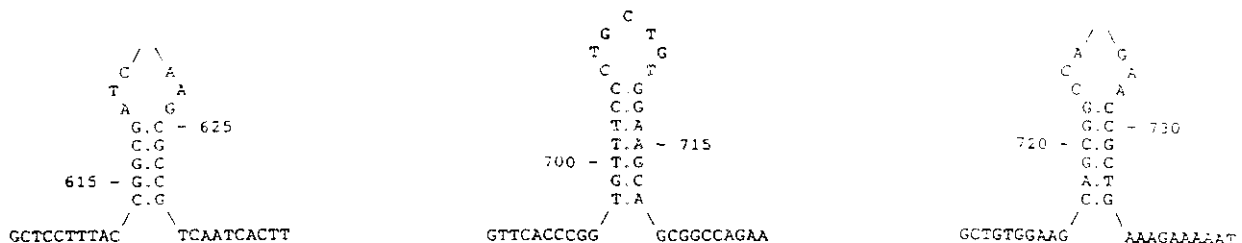


Fig. 18.- Detalle de las horquillas en el promotor del gen clonado.

2.C. Terminador.

En la secuencia que va a continuación del triplete TGA situado en la posición 1909 (Fig. 17) hay otros codones de fin de traducción en la misma pauta, situados en las posiciones 1975 (a 67 pb del final de la secuencia estructural), 2086 (a 178 pb)

y 2170 (a 262 pb). En esta zona el contenido en A+T es del 54,5 % frente al 38,8 % de la zona estructural, lo que puede indicar que existen señales de poliadenilación [312].

No se encuentra la señal consenso de poliadenilación AATAAA presente en mamíferos y en algunos genes fúngicos [23, 153, 312, 411]. Sin embargo, aparecen dos cajas similares pero invertidas y complementarias en las posiciones 1941 (TTATT) y 2090 (TTATTT), es decir, a 29 y a 88 pb del triplete TGA, respectivamente, y separadas ~60 pb entre sí (Fig. 17). La secuencia TTTTATA, repetida 17 pb más adelante, se ha asociado con parte de la funcionalidad de la terminación en levadura [165, 311, 411]. Inmediatamente después de la secuencia TTATTT aparece el motivo TGTGTTCT, que comienza en la posición 2096. Este motivo se ajusta a la secuencia consenso YGTGTTY, es frecuente que aparezca ~30 pb detrás de la señal de poliadenilación AATAAA de mamíferos y es esencial para la formación del extremo 3' del mensajero [262, 311, 411]. Por otra parte, está descrito que la terminación en el gen *pyr-4* de *N. crassa* ocurre en tres sitios distintos. El primero de ellos está situado a 9 pb del codón de fin de traducción, en la secuencia GGgG [137]. En el terminador del gen clonado los 15 primeros nucleótidos tienen un contenido del 80% en G, y concretamente las posiciones 4ª a la 9ª son guaninas.

No se encontraron otros motivos comunes con los terminadores de otros genes estructurales de OMPdecasas ni con otros terminadores de genes de *C. acremonium*.

3. COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS.

3.A. Alineamiento.

El hecho de que existan otros genes secuenciados que codifican para OMPdecasas en otras especies permite hacer un

COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS

ESPECIE	REF.	kDa	Nº AA	AA ELIMINADOS		AA ALINEADOS
				N-TERM	C-TERM	
<i>Homo sapiens</i>	[374]	27,7	254	23	3	228
<i>Mus musculus</i>	[285]	27,7	255	23	4	228
<i>Ustilago maydis</i>	[223]	30,9	283	30	4	249
<i>Schizophyllum commune</i>	[125]	30,0	278	30	5	243
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	[150]	29,4	264	30	4	230
<i>Mucor circinelloides</i>	[33]	29,5	265	27	6	232
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	[101]	29,9	267	30	6	231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[329]	29,2	267	27	5	235
<i>Kluyveromyces lactis</i>	[353]	29,2	267	27	5	235
<i>Candida albicans</i>	[240]	30,0	270	29	4	237
<i>Aspergillus nidulans</i>	[283]	30,0	274	30	3	241
<i>Aspergillus niger</i>	[413]	30,2	277	30	4	243
<i>Penicillium chrysogenum</i>	[64]	29,8	275	30	4	241
<i>Dictyostelium discoideum</i>	[186]	26,2	236	6	1	229
<i>Trichoderma reesei</i>	[367]	41,2	381	32	3	346
<i>Cephalosporium acremonium</i>	[399]	41,1	376	32	2	342
<i>Neurospora crassa</i>	[279]	43,9	397	38	5	354
<i>Escherichia coli</i>	[389]	26,3	245	12	2	231
<i>Salmonella typhimurium</i>	[377]	26,2	245	12	2	231
<i>Bacillus subtilis</i>	[318]	30,0	239	1	1	237
<i>Myxococcus xanthus</i>	[212]	30,4	288	28	2	258

Tabla 2.- Deleciones simuladas en los extremos amino y carboxilo de OMPdecasas con secuencia conocida (por deducción a partir de la secuencia de nucleótidos) para poder alinearlas con los programas CLUSTAL [169] o PALIGN [146].

alineamiento de sus proteínas y detectar ciertos rasgos de interés. Para alinear las secuencias protéicas con mayor fiabilidad se eliminó parte de los extremos amino y carboxilo de todas ellas (Tabla 2), basándose en una serie de alineamientos previos orientativos que no se muestran.

El extremo amino resultó estar poco conservado en el conjunto de todas las OMPdecasas estudiadas. Se quitaron entre 6 y 32 aminoácidos del extremo N-terminal, dejando todas las secuencias de eucariotas con una lisina (o una arginina, en el caso de *M. circinelloides*) como primer residuo conservado (Tabla 2). Para poder alinear las secuencias de procariotas se eliminaron 12 aminoácidos del extremo amino en *E. coli* y en *S. typhimurium*, quedando treonina en lugar de lisina -cambio no conservado- como primer residuo, pero dejando un alineamiento aceptable con respecto a las secuencias de eucariotas. En *B. subtilis* se eliminó un sólo aminoácido para dejar lisina como extremo N-terminal y en *M. xanthus* se quitaron 28 aminoácidos para dejar arginina como extremo amino. En los genes bifuncionales, como es el caso de *D. discoideum*, *M. musculus* y *H. sapiens* (cfr. el apartado 1 de la Discusión), la eliminación de aminoácidos en el extremo N-terminal se refiere a lo correspondiente del dominio OMPdecasa.

De los extremos carboxilo se eliminaron entre 1 y 6 residuos, dejando como último aminoácido una lisina o una arginina en una zona relativamente bien conservada desde el residuo básico hacia la zona aminoterminal (Tabla 2).

No se incluyeron las secuencias de otras cepas de *S. cerevisiae* [329], *T. reesei* [36], *K. lactis* [270] ni otra secuencia del gen humano [373]. Estas secuencias varían como máximo en 4 aminoácidos con respecto a las empleadas en este trabajo o la diferencia se encuentra en las zonas flanqueantes.

El alineamiento en las condiciones citadas para las secuencias de eucariotas mediante el programa CLUSTAL de PC/Gene [169] y mostrado en la Figura 19: A) Indica que existen dos inserciones principales -una de ~100 aminoácidos (posiciones 115-

217 de la proteína recortada de *C. acremonium*) y otra de ~10 aminoácidos (posiciones 279-286)- que sólo se encuentran en las proteínas de *C. acremonium*, *T. reesei* y *N. crassa*. B) Pone de manifiesto que existen varias zonas conservadas en todas las proteínas comparadas, y por tanto prueba definitivamente que el DNA clonado corresponde al gen estructural para la OMPdecase de *C. acremonium*. Las OMPdecasas no tienen motivos comunes con otras descarboxilasas ni con otras enzimas del metabolismo de las pirimidinas [321].

Las inserciones citadas tienen unas longitudes fuera del rango de la mayoría de los intrones fúngicos y no presentan las señales consenso típicas [23, 153, 322], ni similitud con los intrones de otros genes de *C. acremonium* [157, 255; 184]. Que estas secuencias muy probablemente no sean intrones corrobora los resultados anteriores en cuanto a la complementación de *E. coli* FB1009 (apartado 1.D) y en cuanto a la expresión de la proteína de *C. acremonium* en *E. coli* MC4100 (apartado 1.E). No tienen un uso de codones distinto del conjunto de sus proteínas respectivas y se alinean bien entre ellas (no se muestra). La inserción mayor muestra un % de similitud considerable, aunque siempre menor que el conjunto de la proteína (Tabla 3). Esto permite sugerir, junto con el hecho de su ausencia en otras OMPdecasas, que no es una zona esencial para la actividad del enzima, como han señalado otros autores [37]. De la Tabla 3 también se deduce el mayor parecido de las tres especies citadas frente al resto. Con ello se puede situar a *C. acremonium* y a *T. reesei* -ambos deuteromicetos- como emparentados con *N. crassa* en la clase de los pirenomicetos. Este resultado coincide con los estudios de evolución del RNA ribosómico 5S de *C. acremonium* y *N. crassa* [77, 174] y justifican el nombre de *pyr-4* para el gen clonado, respetando la prioridad de nomenclatura de *N. crassa*. La similitud en cuanto a nucleótidos llevada a cabo con el programa NALIGN de PC/Gene [146] también pone de manifiesto estas semejanzas: aproximadamente 69% entre *C. acremonium* y *N. crassa*, 75% entre *C. acremonium* y *T. reesei*, 69% entre *N. crassa* y *T.*

RESULTADOS

Fig. 19 (en la página siguiente).- Alineamiento de OMPdecasas de eucariotas con secuencia conocida. Para mejorar el resultado se recortó parte de los extremos amino y carboxilo como se indica en el texto y en la Tabla 2. Se señalan con asteriscos los aminoácidos idénticos en eucariotas, y con asteriscos subrayados, aquellos residuos que también son idénticos o similares en procariotas. Con un punto se indican los aminoácidos similares en eucariotas, y con un punto subrayado, los aminoácidos que también son similares en procariotas. En los procariotas no se incluye la secuencia de *Myxococcus xanthus*. Se han destacado entre dos líneas horizontales e indicado con números romanos las cinco zonas mejor conservadas. Abreviaturas: HOMO=*Homo sapiens*; MUSM=*Mus musculus*; USTI=*Ustilago maydis*; SCOM=*Schizophyllum commune*; SPOM=*Schizosaccharomyces pombe*; MUCO=*Mucor circinelloides*; PHYC=*Phycomyces blakesleeanae*; SCER=*Saccharomyces cerevisiae*; KLAC=*Kluyveromyces lactis*; CALB=*Candida albicans*; ANID=*Aspergillus nidulans*; ANIG=*Aspergillus niger*; PENI=*Penicillium chrysogenum*; DICT=*Dictyostelium discoideum*; TRIC=*Trichoderma reesei*; CEPH=*Cephalosporium acremonium*; NEUR=*Neurospora crassa*.

ESPECIES COMPARADAS	¿ DE AMINOACIDOS		
	IDÉNTICOS	CONSERVADOS	TOTAL
<i>C. acremonium</i> / <i>N. crassa</i>	58,5 (48,5)	11,4 (9,3)	69,9 (57,8)
<i>C. acremonium</i> / <i>T. reesei</i>	74,5 (56,3)	9,0 (8,7)	83,5 (65,0)
<i>N. crassa</i> / <i>T. reesei</i>	60,4 (53,6)	11,0 (9,3)	71,4 (62,9)
<i>C. acremonium</i> / <i>A. nidulans</i>	46,7	13,1	59,8
<i>C. acremonium</i> / <i>S. cerevisiae</i>	44,2	13,9	58,1
<i>C. acremonium</i> * / <i>E. coli</i> *	13,4	3,0	16,4
<i>C. acremonium</i> * / <i>H. sapiens</i> *	47,6	11,0	58,6
<i>E. coli</i> * / <i>H. sapiens</i> *	9,5	0,4	9,9

Tabla 3.- Comparación entre las OMPdecasas (deducidas por secuencia de nucleótidos) de *C. acremonium*, *T. reesei* y *N. crassa* frente a las de otras especies representativas para establecer el grado de similitud, según el programa PALIGN [146]. Se usó la secuencia completa de las proteínas excepto en los casos señalados con un asterisco, en los que, para poder emplear las mismas condiciones del programa, se simuló deleciones en los extremos amino y carboxilo como se indica en la Tabla 2. Entre paréntesis se muestran los valores resultantes de comparar solamente la inserción de ~100 aminoácidos presente en las tres especies citadas al principio y que no aparece en las demás OMPdecasas.

I

II

III

75

RESULTADOS

reesei, 65% entre *C. acremonium* y *A. nidulans* y 62% entre *C. acremonium* y *S. cerevisiae*. Las inserciones citadas justifican además el aumento medio de ~12 kDa en las OMPdecasas de pirenomicetos frente a las demás (Tabla 2). Este hecho se cuestionó al comparar la secuencia de *N. crassa* con la de *S. cerevisiae*, hasta que se demostró que el gen de *Neurospora* no tenía intrones [137].

El alineamiento permite detectar cinco zonas principales conservadas en todas las OMPdecasas (Fig. 19). Este resultado es coherente con los últimos alineamientos publicados, menos completos en cuanto al número de especies incluidas en el estudio [37, 101, 212, 318, 321, 367, 400]. Exceptuando la zona señalada como IV, todas las demás zonas tienen una correspondencia aceptable en procariotas.

Entre estas regiones destaca el hexadecapéptido que ocupa la segunda zona conservada (Figs. 19 y 20-B), en el que 12 aminoácidos son iguales (75% de identidad). En la 2ª posición sólo hay una metionina frente a 16 isoleucinas, cambio que es conservado, y análogamente ocurre en la 3ª posición (una leucina frente a 16 isoleucinas). En el hexadecapéptido sólo aparece variación en las posiciones décima y decimocuarta, por lo que, desde el punto de vista funcional, la similitud de la zona podría considerarse como del 87% (14/16) en el conjunto de eucariotas.

Si se hace un alineamiento incluyendo las secuencias de procariotas pero exceptuando *M. xanthus* (no se muestra, aunque se indica en la Fig. 19), disminuye la amplitud de las zonas conservadas. Sin embargo, se sigue manteniendo el espaciado común entre ellas con la salvedad señalada de los tres pirenomicetos. En las proteínas de *E. coli* y *S. typhimurium* sigue estando presente un péptido de 15 aminoácidos muy parecido al descrito en la zona II (Figs. 19 y 20). En el pentadecapéptido de enterobacterias hay 8 residuos idénticos y uno conservado con respecto al péptido de eucariotas.

Lo que más llama la atención de la comparación de ambos péptidos es la compensación de carga que se produce entre los

COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS

A)

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a
<i>Homo sapiens</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Mus musculus</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Ustilago maydis</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Schizophyllum commune</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Mucor circinelloides</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F	L	L	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Kluyveromyces lactis</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Candida albicans</i>	F	M	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Aspergillus nidulans</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	I	D	I	G	N	T	V
<i>Aspergillus niger</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	I	D	I	G	N	T	V
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	I	D	I	G	N	T	V
<i>Dictyostelium discoideum</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	A	D	I	G	N	T	V
<i>Trichoderma reesei</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	G	D	I	G	H	T	V
<i>Cephalosporium acremonium</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	G	D	I	G	N	T	V
<i>Neurospora crassa</i>	F	L	I	F	E	D	R	K	F	V	D	I	G	S	T	V
<i>Escherichia coli</i>	F	D	I	F	L	D	L	K	F	H	D	I	P	N	T	A
<i>Salmonella typhimurium</i>	F	D	V	F	L	D	L	K	F	H	D	I	P	N	T	T
<i>Bacillus subtilis</i>	C	E	L	F	L	D	L	K	L	H	D	I	P	T	T	V
<i>Myxococcus xanthus</i>	T	L	T	L	L	D	V	K	R	G	D	I	G	S	T	M

B)

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a
	*	.	.	*	*	*	*	*	*	.	*	*	*	.	*	*
CONSENSO EUCARIOTAS	F17	L16	I16	F17	E17	D17	R17	K17	F17	A11	D17	I17	G17	N15	T17	V17
		M1	L1							I3				H1		
										G2				S1		
										V1						

C)

	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a
	.	.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	.	*
CONSENSO PROCARIOTAS	F2	D2	I1	F3	L3	D3	L3	K3	F2	H3	D3	I3	P3	N2	T3
	C1	E1	L1						L1					T1	
			V1												

Fig. 20.- Motivo mejor conservado en las OMPdecasas. En A) se muestra el detalle de la zona II (Fig. 19) y se han añadido los péptidos de las cuatro proteínas de procariotas. Se han recuadrado los 5 aminoácidos idénticos en las 21 especies estudiadas. En B) y en C) se han señalado con un punto los cambios conservados y con un asterisco los aminoácidos idénticos. En C) se muestra el consenso de procariotas sin incluir *M. xanthus*.

RESULTADOS

aminoácidos en las posiciones 2ª y 5ª: leucina -o metionina- (posición 2ª) y glutámico (5ª) en eucariotas, frente a aspártico (2ª) y leucina (5ª) en enterobacterias (Fig. 20). Teniendo en cuenta este razonamiento, la similitud de la zona desde el punto de vista funcional entre enterobacterias y eucariotas sería del 73% (11/15). El argumento es análogo en el caso de *B. subtilis*, con la excepción de que el primer aminoácido de la zona mencionada es cisteína en lugar de fenilalanina, aunque también el aminoácido que ocupa la posición 16ª es una valina que se conserva en todos los eucariotas. El caso de *M. xanthus* se aleja más de las otras 20 especies incluidas en esta comparación. La poca similitud del grupo de las mixobacterias con los demás grupos de bacterias confirma estudios llevados a cabo con otros genes [212]. No obstante, cuando se hace un alineamiento con las 21 OMPdecasas, esta especie sigue conservando 5 aminoácidos idénticos en la zona II con respecto al resto de las proteínas (Fig. 20); y 6 aminoácidos idénticos con respecto a las otras tres especies de bacterias (contando la leucina de la posición 5ª), a los que habría que añadir el cambio conservado de valina por leucina (posición 7ª).

Los valores de similitud en la zona descrita contrastan con los valores globales que se mostraron en la Tabla 2. Esta zona conservada desde procariotas hasta el hombre se describió originalmente al comparar las únicas dos secuencias que se conocían en aquel momento -levadura y ratón-, y ya entonces se postuló que debía desempeñar un papel importante en la actividad OMPdecasa [285]. Actualmente se sabe que la lisina en la posición 8ª de la Figura 20 es esencial para la catálisis [212]. En cualquier caso, en eucariotas presenta 6 aminoácidos seguidos perfectamente conservados (FEDRKF) entre las posiciones 4ª y 9ª (Fig. 20) y de ello se tratará en el apartado 2 de la Discusión.

3.B. Arbol filogenético.

El programa CLUSTAL empleado en el alineamiento también permite hacer un dendrograma con las secuencias comparadas (Fig. 21). Es obvio que el árbol filogenético resultante es erróneo en

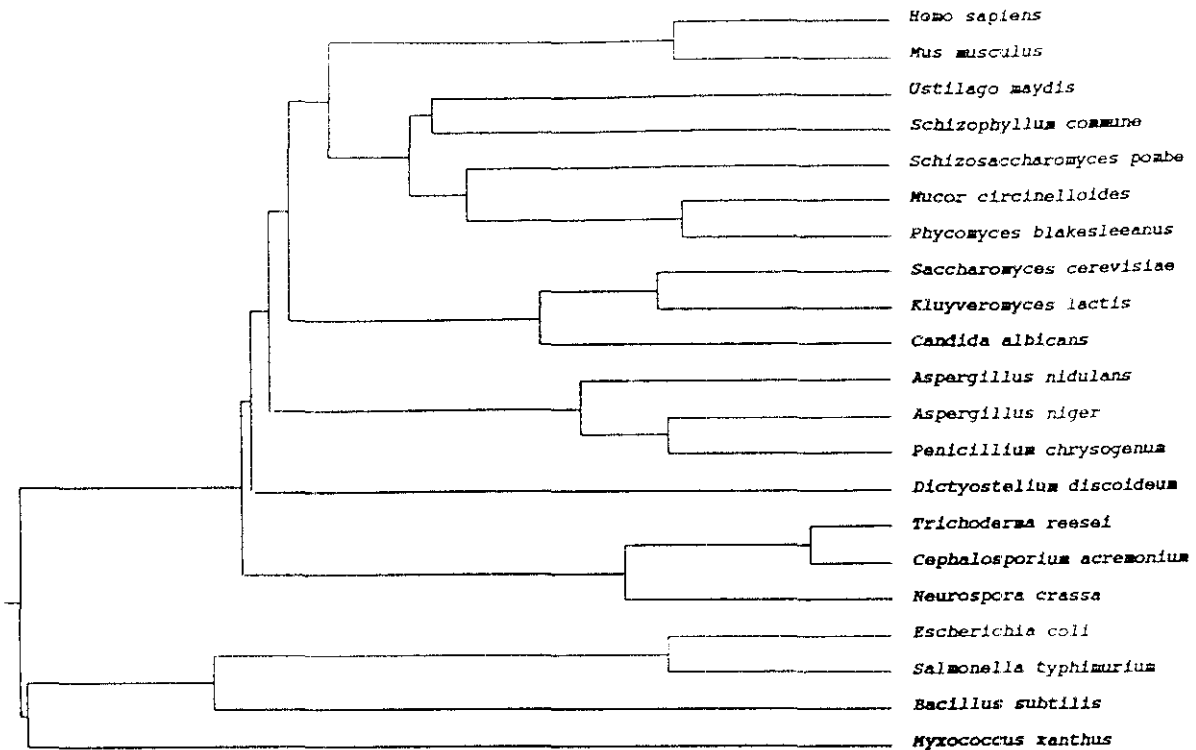


Fig. 21.- Dendrograma elaborado con el programa CLUSTAL [169] con OMPdecasas de secuencia conocida. Se recortó parte de los extremos amino y carboxilo como se indica en la Tabla 2.

su conjunto puesto que, por ejemplo, coloca a *D. discoideum* separándose entre pirenomicetos (*T. reesei*, *C. acremonium*, *N. crassa*) y plectomicetos (*A. nidulans*, *A. niger*, *P. chrysogenum*), cuando el hecho de tener el gen bifuncional (cfr. el apartado 1 de la Discusión) debería situarlo más cercano a la divergencia de ratón y hombre que a cualquier otro grupo de entre las especies incluidas en este estudio. De todos modos, *D. discoideum* (mixomiceto) es difícil de clasificar, y también se le ha situado

separándose de la rama animales-hongos posterior a la divergencia con procariotas [82]. Sin embargo, el dendrograma también tiene aciertos, como separar en primer término a procariotas de eucariotas; o hacer grupos con pirenomicetos, con plectomicetos o con endomicetos (*S. cerevisiae*, *K. lactis*, *C. albicans*); o al agrupamiento que hace entre *S. commune* y *U. maydis* (basidiomicetos), *Ph. blakesleeanus* y *M. circinelloides* (zigomicetos) y *S. pombe*, un organismo -este último- difícil de clasificar también según la secuencia de su RNA 5S [77, 174].

4. AISLAMIENTO DE MUTANTES AUXOTROFOS.

Los resultados anteriores permitían afirmar que los plásmidos pAV1, pAV2 y pAV3 (Fig. 12) podrían servir como vectores para transformar mutantes de *C. acremonium* afectados en el gen *pyr-4*.

Se hicieron experimentos para buscar los mutantes citados, así como mutantes del tipo *arg-12* o *trp-1*, susceptibles de ser complementados, por ejemplo, con los genes *argB* de *A. nidulans* [39, 392] o *trpC* de *P. chrysogenum* [303, 341]. Los índices de supervivencia de 1-15% se consiguieron tras 3-4 minutos de irradiación de esporas con luz ultravioleta o tras incubar esporas con nitrosoguanidina en concentración final de 50-100 µg/mL durante 60 minutos (15 minutos en el caso de germinulas).

En los experimentos preliminares se observó que, aún con la máxima concentración de ácido 5-fluororótico (FOA) empleada (1 mg/mL), aparecía crecimiento sintrófico en las placas sembradas con esporas mutagenizadas. Para mejorar la selección se determinó aumentar la frecuencia relativa de mutantes auxótrofos en las suspensiones de esporas mutagenizadas mediante filtración. En el microscopio se observó que las esporas tenían un tamaño adecuado como para atravesar el material filtrante empleado, mientras que las germinulas con 12 horas de incubación no podían hacerlo

(aproximadamente la mitad del diámetro de los poros en el caso de esporas frente a 1-5 veces en el caso de las germinulas). La titulación de una suspensión de esporas sin mutagenizar antes y después de filtrar sirvió para comprobar que no quedaban esporas retenidas. En la Figura 22 se muestra la cinética de un experimento de obtención de mutantes con luz ultravioleta enriqueciendo por filtración. En la práctica basta con hacer una o dos filtraciones más desde que no se observa turbidez en el matraz por la germinación de conidios.

De este modo pudieron obtenerse típicamente decenas o centenares de colonias partiendo de $\sim 10^8$ esporas supervivientes de la mutagénesis, aunque la mayoría (70-90%) son bradítrofes mediante comprobación posterior. En la Figura 23 se ilustran mutantes caracterizados bloqueados en la ruta de síntesis de la arginina, aislados a partir de tratamiento con luz ultravioleta y enriqueciendo por filtración.

Si bien este método dio buen resultado para obtener mutantes bloqueados en la ruta de síntesis de la arginina o del triptófano, en ningún caso se obtuvieron mutantes *pyr-4*. Las esporas supervivientes de la mutagénesis, enriquecidas por filtración y plaqueadas en presencia de FOA y uracilo o uridina siempre dieron lugar a colonias protótrofes y resistentes al FOA. En un caso en que no se incluyó FOA en las placas de recuperación se obtuvieron 2 mutantes auxótrofos en la biosíntesis de pirimidinas. La caracterización posterior mostró que eran sensibles al FOA y que podían crecer suplementando con ácido orótico, por lo que presumiblemente estaban afectados en la actividad dihidroorotato deshidrogenasa y podían ser -por analogía con *N. crassa*- mutantes *pyr-1* (cfr. la Fig. 32). Al mismo resultado de obtención de colonias resistentes al FOA y protótrofes se llegó cuando se utilizó nitrosoguanidina como agente mutagénico en esporas o en germinulas.

Los mutantes aislados y caracterizados mostraron, en general, poco vigor en relación con la cepa parental, una esporulación nula o muy deficiente y en ocasiones alteración en

RESULTADOS

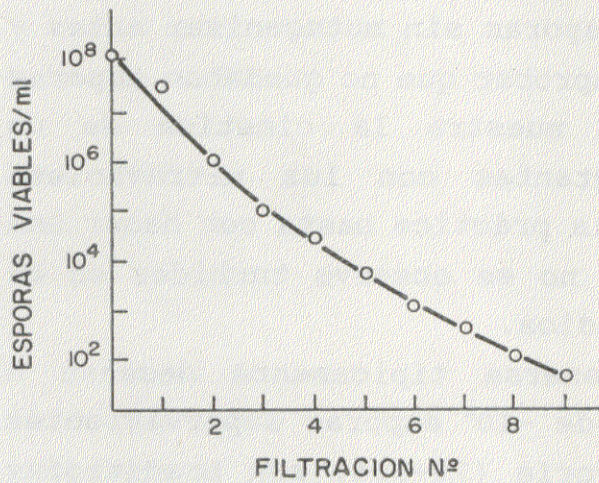


Fig. 22.- Cinética de enriquecimiento en mutantes auxótrofos por filtración. Cada punto representa la media de la lectura de dos placas distintas con la misma dilución, salvo el de la filtración n° 9, que corresponde al total de colonias recuperadas al acabar el experimento. Las filtraciones se hicieron cada 12 horas. Detalles en el texto.

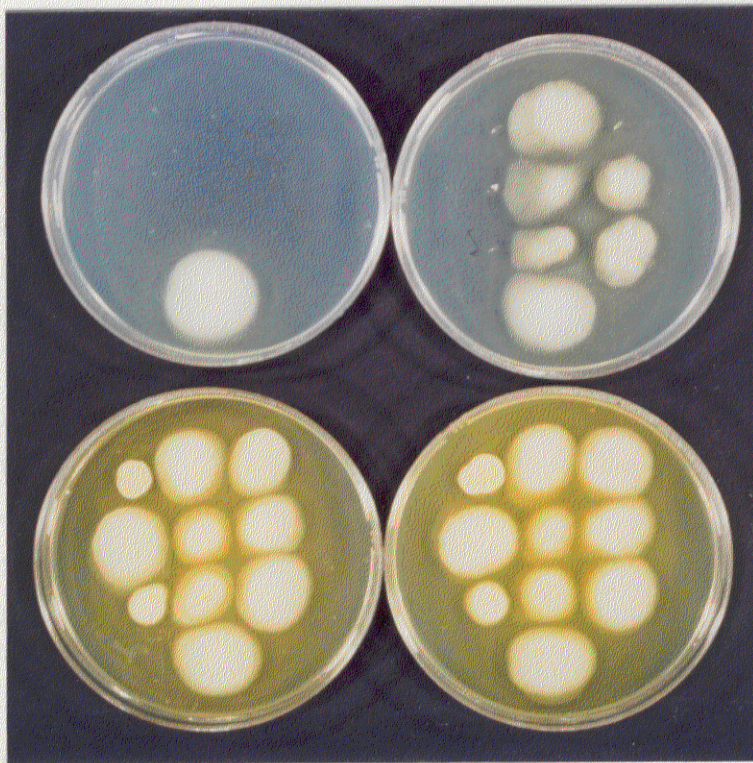


Fig. 23.- Caracterización de mutantes de *C. acremonium* bloqueados en la síntesis de arginina. Las placas son de medio mínimo y están sin suplementar (superior izquierda) o suplementadas con ornitina (superior derecha), citrulina (inferior izquierda) o arginina (inferior derecha). La colonia replicada en la parte inferior de las cuatro placas es la estirpe silvestre, protótrofa (control positivo).

la morfología de la colonia. La escasa esporulación dificultaba la manipulación posterior y la estimación de la frecuencia de reversión. A la vista de estos resultados se decidió continuar el trabajo para establecer un sistema de transformación por medio de resistencia a alguna droga, tal como se apuntó en la Introducción (Fig. 7), usando el promotor del gen clonado.

5. SENSIBILIDAD A FLEOMICINA.

Con objeto de determinar si el crecimiento de *C. acremonium* resultaba inhibido por fleomicina y estimar la concentración en la que ésta debía usarse en experimentos de transformación, se efectuó un barrido por duplicado en placas con distinta concentración de la droga citada. Se sembraron 10^7 esporas viables en cada placa con medio mínimo sólido de regeneración de protoplastos (MRP). El número de esporas plaqueadas correspondía con el número de protoplastos viables en cada placa de transformación (ver más adelante). Se emplearon las concentraciones de 0 - 0,31 - 0,62 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 y 20 μg de fleomicina por mL de medio. La incubación de las placas durante 2 semanas a 28 °C mostró que no había crecimiento a partir de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ hacia concentraciones superiores, y que con 0,31 y 0,62 $\mu\text{g/mL}$ ya aparecían resistentes espontáneos y crecimiento sintrófico. Se determinó trabajar con concentraciones en el rango de 1,25 a 5 μg de fleomicina/mL en los experimentos posteriores de transformación.

6. CONSTRUCCION DE UN VECTOR DE TRANSFORMACION PARA SELECCIONAR POR RESISTENCIA A FLEOMICINA.

Para aumentar la resistencia a fleomicina en los protoplastos transformados, se hizo una fusión traduccional entre el promotor más los 10 primeros triplete del gen *pyr-4* de *C.*

RESULTADOS

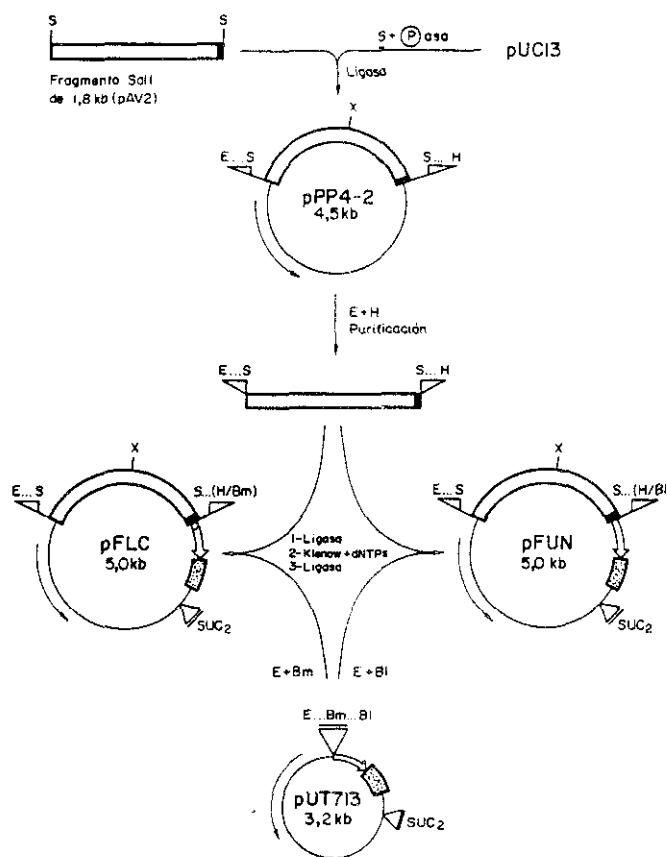


Fig. 24.- Esquema a escala del método para construir una fusión traduccional *pyr-4'*::'*Shble* (pFUN) y su control (pFLC). Con caja hueca se representa el promotor y los primeros tripletes (en negro) del gen *pyr-4* de *C. acremonium*; con flecha hueca, el gen *Shble*; con caja punteada, el terminador *CYC-1* de levadura; con línea sencilla, el plásmido pUT713; y con flecha sencilla, el gen de la β -lactamasa. Sólo se muestran los sitios de restricción necesarios para la aclaración del esquema.

Se aisló el fragmento SalI de 1,8 kb a partir del plásmido pAV2 (Fig. 12) y se clonó en pUC13, dando lugar a los plásmidos pPP4-1 y pPP4-2. La denominación de los plásmidos pPP4-1 y pPP4-2 alude a que la orientación del promotor con los primeros tripletes del gen *pyr-4* sea la misma o la opuesta a la del gen de la β -galactosidasa de pUC13, respectivamente. El inserto del plásmido pPP4-2 se aisló tras digestión con EcoRI y HindIII para tener un extremo susceptible de ligar más tarde con pUT713 abierto con EcoRI y BalI o abierto con EcoRI y BamHI, según se tratase de la construcción pFUN o la construcción control pFLC, respectivamente. Una vez ligadas ambas construcciones por sus respectivos sitios EcoRI con los insertos de 1,8 kb, se hizo un tratamiento con el fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato. De este modo los sitios HindIII quedaban romos para poder sellarlos posteriormente mediante ligasa con el extremo BamHI rellenado en el caso de pFLC, o con BalI (que corta dejando extremos romos) en el caso de pFUN.

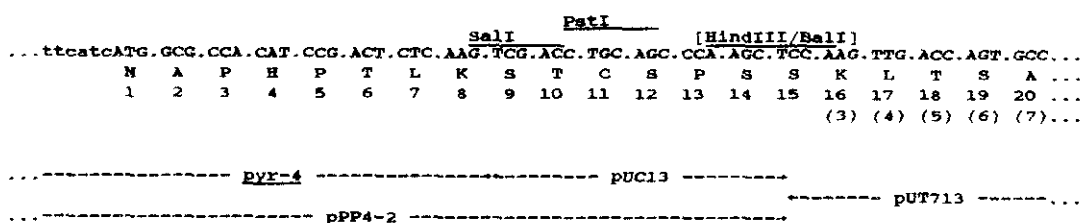
Abreviaturas: Ba=BalI; Bm=BamHI; dNTPs=desoxirribonucleótidos trifosfato; E=EcoRI; H=HindIII; (P)asa=fosfatasa alcalina; S=SalI; SUC₂=sitios únicos de clonación adicionales de pUT713; X=XmaIII.

VECTOR DE TRANSFORMACION

acremonium y el gen *Shble* del vector pUT713 (Fig. 8). La construcción funcional se denominó pFUN, y la construcción control -interrumpida por un codón de fin de traducción, como se verá a continuación- se denominó pFLC. En la Figura 24 se esquematiza el método seguido para obtener ambos plásmidos.

Hay que mencionar que en la descripción de los sitios únicos de clonación inmediatamente anteriores al gen *Shble* de pUT713 [60, 108], no se indica que existe un sitio *BalI* al principio del gen citado (Fig. 8) y que resultó ser único en todo el plásmido. Este sitio fue muy útil para construir pFUN (Fig. 24), aunque se pierden los dos primeros aminoácidos de la proteína *Shble*. El resultado neto, como se detalla en la Fig. 25, es que en pFUN se puede suponer una fusión traduccional *pyr-4'::'Shble*, en la que interviene DNA de pUC13, y que codifica para una proteína de 137 aminoácidos en lugar de los 124 residuos que posee la proteína original del gen *Shble* [108]. Por el contrario, en la construc-

pFUN



pFLC

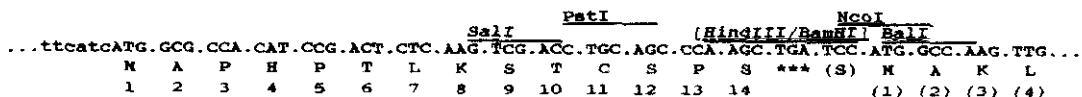


Fig. 25.- Detalle de las fusiones traduccionales en pFUN y pFLC. Se ha acotado con flechas la procedencia de los nucleótidos que intervienen en cada una de ellas. Entre corchetes se muestran los sitios de restricción destruidos al llevar a cabo cada construcción. Los números indican el orden en la secuencia de aminoácidos en cada fusión, empezando por la primera metionina del gen *pyr-4* de *C. acremonium* (Fig. 17). Entre paréntesis se señala el número ordinal que presentan los aminoácidos en la proteína del gen *Shble*. Los tres asteriscos indican el codón de fin de traducción que se produce en pFLC.

ción de control pFLC se produce una fusión entre DNA de *C. acremonium* y pUC13 que queda interrumpida por un codón ópalo después del decimoquinto aminoácido, situándose un triplete más adelante el gen *Shble* intacto.

El vector pFUN para transformar *C. acremonium* por resistencia a fleomicina presenta los siguientes sitios únicos de clonación: 1) *EcoRI*, *SstI*, *BamHI* y *XbaI*, procedentes de pUC13 y situados en la zona distal del promotor del gen *pyr-4*. El sitio *SmaI* que también está presente en esa zona no es único pues existe otro en el gen *Shble* [108]. 2) El sitio *HindIII* que hay a continuación del terminador *CYC-1* (Fig. 8). 3) Los sitios adicionales de clonación de pUT713 desde *BglIII* hasta *ClaI* (Fig. 8), salvo *XmaIII*, que también está presente en el promotor fúngico y en el gen *Shble*.

Se conoce la secuencia de pFUN salvo los ~1000 pb que hay en la zona distal del promotor del gen *pyr-4*. Los ~800 pb que hay a continuación se mostraron en la Figura 17 y el resto -pUT713 (Fig. 8)- está descrito con detalle [60] sobre la base de pUC19 [417].

7. OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

Para hacer las células competentes al DNA transformante era necesario obtener protoplastos, según se ha señalado en la Introducción. Los protocolos existentes para *C. acremonium* eran laboriosos y necesitaban el pretratamiento del micelio con un agente reductor, el uso de más de una enzima lítica o tiempos de incubación largos [160, 300, 315]. Se determinó poner a punto otro método más sencillo, basado en el de *A. nidulans* [380] y usando como enzima lítica el preparado comercial Novozym 234, que había dado buen resultado en otras especies de hongos, incluido *C. acremonium* [160, 356, 357]. El protocolo final se ha detallado en la sección de Materiales y Métodos.

Con objeto de tener micelio en un estado fisiológico lo más homogéneo posible y de este modo aumentar la reproducibilidad de los experimentos, se partió de conidios conservados en agua y glicerina a -20°C . El inconveniente *a priori* de que la cepa silvestre de *C. acremonium* no esporule en placa, pero que lo haga de forma considerable en medio líquido, resultó ser una ventaja al poder usar suspensiones concentradas de esporas previamente preparadas que se conservan congeladas y mantienen la misma viabilidad y el mismo rendimiento en micelio durante ~2 años.

Se obtuvieron $2,5 (\pm 0,4)$ g de micelio escurrido por cada 100 mL de cultivo líquido durante 24 horas de crecimiento en 47 experimentos independientes. El aspecto microscópico típico del micelio obtenido muestra esferas con un diámetro de 0,2-1 mm de diámetro en preparaciones por aplastamiento (*squash*), formadas por la germinación de una o varias conidiosporas juntas y típicas de un modelo de crecimiento estromático [309]. Con tiempos de incubación mayores (36 ó 48 horas) se prolongaba el tiempo de incubación con enzima lítica y descendía el rendimiento en protoplastos y su viabilidad, como suele ser la norma [402]. No todas las veces que se obtuvieron protoplastos se dirigieron a transformar por resistencia a fleomicina como se indicará más adelante, ya que también se intentó la transformación con otros marcadores, incluso con otras fusiones *pyr-4'::Shble*. Estos resultados no se muestran por ser inconsistentes o negativos, pero se hace de los pasos comunes a todos ellos, como es el dato del peso de micelio obtenido, con el fin de tener valores estadísticos.

El tiempo de incubación con enzima lítica osciló normalmente entre 1 y 2 horas. Se observó variación según lotes de enzima y su grado de envejecimiento en cuanto a tiempo de incubación necesario, rendimiento en protoplastos y viabilidad de los mismos. El número de protoplastos obtenidos por gramo de micelio escurrido fue de $7,1 (\pm 2,5) \times 10^9$ mediante recuento en hematocitómetro, de tamaño muy variable.

Para purificar los protoplastos de los restos de micelio sin

RESULTADOS

digerir se hizo una centrifugación en gradiente. Se obtuvieron 4 fases que, descritas desde el fondo del tubo hacia la parte superior, mostraron los siguientes contenidos por observación microscópica: 1) Una fase sólida, formada por restos de micelio sin digerir con protoplastos atrapados. 2) Una fase líquida con pocos restos de micelio y escasos protoplastos, de tamaño muy pequeño (criterio cualitativo). 3) Una interfase opaca -la de interés- constituida por protoplastos muy concentrados y de tamaño grande (~20%) o intermedio. 4) Una fase superior con muy pocos protoplastos, de tamaño pequeño. De la interfase mencionada donde están mayoritariamente los protoplastos, una vez extraída y lavada, se obtuvieron $1,3(\pm 0,5) \times 10^9$ protoplastos por recuento en hematocitómetro, de tamaño bastante homogéneo y grande. El rendimiento medio en la purificación fue, por tanto, del 18%. En consecuencia, de 1 g de micelio pueden obtenerse fácilmente más de 10 alícuotas con 10^8 protoplastos cada una, que son las que se usan posteriormente en cada ensayo elemental de transformación (ver el apartado siguiente).

El porcentaje de protoplastos viables frente al total resultó ser de $11,5(\pm 4,7)$, establecido por dilución en STC y plaqueo en medio mínimo osmóticamente estabilizado (MRP/MRPb). Se necesita incubar las placas ~2 semanas para llegar al valor final. La proporción de falsos protoplastos o restos de micelio viable (partículas insensibles a dilución osmótica) osciló entre 1/1.000-1/10.000 de los protoplastos totales, y por tanto un 0,1-1% de los protoplastos viables.

La técnica también fue válida para obtener protoplastos de un mutante *arg-12* procedente de tratamiento con luz ultravioleta (*cfr.* el apartado 4) y para la cepa semi-industrial C-10, con las modificaciones que se detallan en la sección de Materiales y Métodos en cuanto a la inoculación. Los valores extremos obtenidos en 3 experimentos con la cepa C-10 fueron los siguientes: 1) Peso escurrido de micelio en 100 mL de cultivo: 2-4 g. 2) Tiempo de incubación en mezcla lítica: 2-3,5 horas. 3) Protoplastos totales de 1 g de micelio: $5-8 \times 10^9$. 4) Protoplastos

purificados: $1-2 \times 10^9$. 5) Viabilidad: 5-20%. 6) Proporción de partículas insensibles a dilución osmótica frente al recuento total: 1/300-1/2.000. Por tanto, salvo el tiempo de incubación con enzima lítica y la proporción de falsos protoplastos o restos de micelio viable, los resultados son similares en las dos cepas de *C. acremonium*.

8. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS Y SELECCION POR RESISTENCIA A FLEOMICINA.

Cuando se añadieron de 5-20 μg de plásmidos con el gen *Shble* y una solución con PEG y calcio (PTC, *cfr.* Materiales y Métodos) a tubos con 10^8 protoplastos se obtuvieron colonias resistentes a fleomicina.

La observación microscópica mostró que los protoplastos aparecen mayoritariamente en agregados de 50-100 unidades en presencia de PTC. La viabilidad después del tratamiento con PTC, plaqueando diluciones en medio mínimo sólido osmóticamente estabilizado, no descendió de forma significativa, manteniéndose en torno al 10 % (11,2 ($\pm 4,0$) %).

Se determinó que el tiempo óptimo para añadir la capa selectiva de fleomicina era de 18-20 horas después de la siembra de los protoplastos, ya que con tiempos menores (añadida a la vez que se plaqueaban los protoplastos, o añadida a las 6 horas) descendía el número de colonias presuntamente transformadas, y con tiempos mayores (48 ó 72 horas) aparecía crecimiento en las placas de control sin DNA. También se comprobó que no había diferencia entre aplicar la fleomicina como una segunda capa con agarosa o extendida con sacarosa y asa de vidrio.

En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos en los experimentos de transformación, llevados a cabo en primer término con la estirpe silvestre. Puede observarse que en el rango de concentraciones empleado no aparecen resistentes espontáneos al

RESULTADOS

CEPA	VECTOR	(μg)	CONC. FLEOMICINA (μg/mL)		
			1,25	2,5	5,0
ATCC 11550	Ninguno	-	0	0	0
	pUT713	(20)	0,25	0,05	0
	pFLC	(20)	0,45	0,15	-
	pFUN	(5)	-	38	23
	pFUN	(10)	-	85	72
	pFUN	(20)	94	93	88
ATCC 48272	Ninguno	-	0	0	0
	pFUN	(10)	96	62	45

Tabla 4.- Transformación de protoplastos de dos estirpes de *C. acremonium* en función de la cantidad y tipo de vector empleado y la concentración de fleomicina usada en la selección. Los valores representan el número de colonias resistentes referidas a μg de DNA de plásmido usando 10^8 protoplastos, de los cuales son viables ~10 % (ver el texto). Cada uno de los valores es la media aritmética de un mínimo de 3 experimentos independientes de obtención y transformación de protoplastos para cada una de las dos cepas. El número de colonias resistentes a fleomicina en las transformaciones con 10 ó 20 μg de pFUN -tanto en la cepa silvestre (ATCC 11550) como en la cepa semi-industrial C-10 (ATCC 48272)- se determinó por extrapolación, sembrando 1/10 del volumen del tubo de transformación por placa.

antibiótico fleomicina. Cuando se transforma con el gen *Shble* sin promotor (pUT713) o con el promotor *pyr-4* en una fusión traduccional interrumpida por un triplete de fin de traducción (pFLC, cfr. la Fig. 25), la frecuencia de aparición de colonias resistentes no llega a 1/μg de DNA transformante. Por el contrario, cuando se añade una cantidad equivalente (20 μg) de pFUN, con una fusión *pyr-4'::'Shble* presuntamente funcional, la frecuencia media de aparición de colonias resistentes aumenta

~200-2.000 veces con respecto a los controles y se aproxima a 100/ μ g de DNA. Existe una proporción muy baja (~1 %) de colonias pequeñas que podrían considerarse transformantes abortivos y que no se incluyeron el cómputo final ni se continuó con su estudio.

Estos resultados demuestran que la fusión *pyr-4'::'Shble* es capaz de codificar para una proteína que confiere resistencia a fleomicina. Asimismo, demuestran que pFUN es capaz de transformar mejor que los controles debido a una transcripción y traducción correctas, ya que en el fragmento *SalI* de 1,8 kb clonado en fase ininterrumpida con el gen *Shble* deben existir las señales necesarias para que haya una transcripción eficaz, y los primeros tripletes del gen *pyr-4* aseguran que la traducción de la proteína híbrida comience correctamente.

En los valores medios máximos se obtienen ~1800 colonias presumiblemente transformadas por tubo de transformación, es decir, usando 10^8 protoplastos con una viabilidad del 10 % y 20 μ g de pFUN. La frecuencia de transformantes/ μ g de pFUN depende de la cantidad de vector pFUN usado (5, 10 ó 20 μ g) y, a juzgar por la proporción, el DNA está limitando el número de transformantes que se podrían obtener. El número de transformantes obtenido con pFUN oscila poco en cada caso, presentando en general un coeficiente de variación de la media <20 % entre experimentos con distintos lotes de protoplastos.

La aparición de transformantes con pFUN comienza a los 5-6 días y normalmente su número no aumenta a partir de los 15 días de incubación de las placas. Es recomendable trabajar con las concentraciones de 2,5 ó 5,0 μ g de fleomicina/mL de medio: el número de colonias obtenido es comparable, pero es mucho menos frecuente el efecto indeseable que se señaló en el apartado de Materiales y Métodos derivado de que las placas no estén perfectamente horizontales. En la Figura 26 se muestra el aspecto de las placas de un experimento de transformación.

Se aplicó el mismo método desarrollado para la estirpe silvestre a la cepa semi-industrial C-10. La viabilidad de los protoplastos tampoco se vio afectada por el tratamiento con PEG.

RESULTADOS

En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos y de ella puede deducirse que la frecuencia de transformación es un 30-40 % inferior en relación con la cepa silvestre en las condiciones en que coinciden ambas (10 μg de pFUN y 2,5 ó 5 μg de fleomicina/mL).

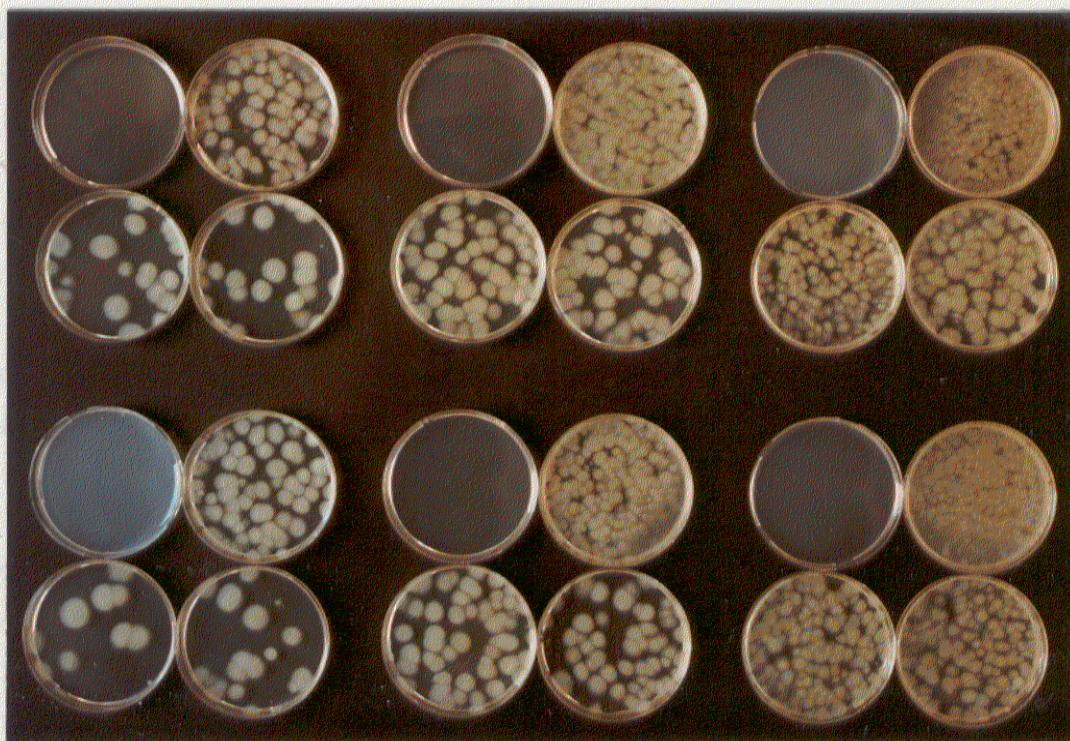


Fig. 26.- Aspecto de placas en experimentos de transformación de *C. acremonium* ATCC 11550 con el vector pFUN. Cada grupo de cuatro placas corresponde a la siembra de dos tubos de transformación: la de la parte superior izquierda, sin DNA (control negativo); la de la parte superior derecha, con 8/10 del volumen del tubo de transformación con DNA; y las dos placas inferiores, con 1/10 cada una del volumen del tubo de transformación con DNA. En la fila superior de grupos de cuatro placas se seleccionó con 2,5 μg de fleomicina/mL, y en la fila inferior, con 5,0 μg /mL. Las columnas de grupos de cuatro placas 1^a, 2^a y 3^a corresponden a transformaciones con 5, 10 ó 20 μg de pFUN, respectivamente.

9. ESTABILIDAD DE LOS TRANSFORMANTES.

Para saber si los transformantes de ambas estirpes no perdían la capacidad de ser resistentes a fleomicina durante su crecimiento, a la vez que se purificaban por haber podido crecer colonias juntas, se hicieron réplicas en medio sólido de regeneración de protoplastos (MRP) con 1,25 μg de fleomicina/mL y sin ella. Se replicaron con palillos 100 colonias procedentes de transformaciones de la estirpe silvestre con 20 μg de pFUN para cada una de las tres concentraciones empleadas de antibiótico, es decir, 300 colonias en total. De la misma forma se replicaron 50 colonias procedentes de transformaciones de la cepa C-10 con las tres concentraciones de fleomicina, es decir, 150 colonias en total. Todas las colonias mantuvieron el fenotipo de resistencia. El procedimiento se repitió dos veces más. Después de tres pases en medio selectivo y no selectivo, todas las colonias siguieron siendo resistentes. Este resultado indica que los transformantes son muy estables, con un índice de inestabilidad $<1/300$ en el caso de la cepa silvestre y $<1/150$ en el caso de la cepa C-10. En la Figura 27 se ilustra el aspecto de placas con réplicas para estudiar la estabilidad.

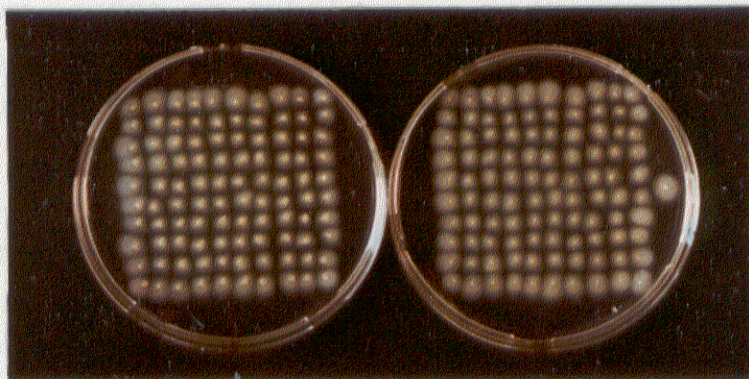


Fig. 27.- Estabilidad de los transformantes. Se muestran placas con 100 colonias procedentes de la transformación de la cepa silvestre de *C. acremonium* con pFUN, seleccionadas con 1,25 μg de fleomicina/mL y replicadas con fleomicina (izquierda) o sin ella (derecha). El control, replicado a la derecha de la cuadrícula en ambos casos, es la cepa sin transformar.

RESULTADOS

De cada grupo de transformantes correspondientes a las dos cepas y a las tres concentraciones de fleomicina usadas en la transformación se escogieron dos clones para estudios posteriores. La nomenclatura empleada para estos clones se detalla en la Tabla 5. De los 12 transformantes señalados se hizo un pase en aislamiento en medio rico (1 clon/placa). Una vez crecidas las placas se hicieron réplicas de 10 colonias aisladas de cada clon en medio con y sin fleomicina como se indicó anteriormente, y se comprobó que todas las colonias mantenían el fenotipo de resistencia. Cada placa de medio rico se raspó con agua y un asa de siembra con objeto de tener micelio crecido en toda la superficie después de varios días adicionales de incubación. Cada una de estas placas sirvió para inocular (con un cultivo intermedio en medio líquido -MDL- de 15 mL) dos matraces con medio líquido (100 mL) por cada clon: uno para estudiar la estabilidad después de un crecimiento a mayor escala sin presión selectiva; y otro para extraer DNA y poder analizar los transformantes por el método de Southern, como se verá en el siguiente apartado.

Los 6 matraces de los transformantes de la cepa silvestre formaron conidios con una viabilidad en el rango de $1-5 \times 10^8$ ufc/mL, es decir, el mismo que el de la cepa sin transformar. Las réplicas con y sin fleomicina de 100 colonias procedentes de cada uno de los 6 transformantes esporulados en matraz mostraron que se mantenía el fenotipo resistente en el 100 % de los casos. Los 6 matraces correspondientes a los 6 transformantes de la cepa C-10, que no forma conidiosporas, mostraron una morfología totalmente normal en medio líquido y una viabilidad en el rango de 10^7-10^8 ufc/mL, es decir, igual que la cepa sin transformar. También en este caso las réplicas de 100 colonias de cada uno de los 6 transformantes mantuvieron la capacidad de crecer con fleomicina en todos los casos. Estos resultados demuestran que el fenotipo adquirido es estable después de varias divisiones mitóticas y, en el caso de la cepa silvestre, incluso después de la formación de conidios.

ESTABILIDAD Y ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES

	CONCENTRACION DE FLEOMICINA EN LA TRANSFORMACION ($\mu\text{g/mL}$)	<u>NOMBRE</u>
Cepa silvestre (ATCC 11550)	1,25	S-A-1
		S-A-2
	2,5	S-B-1
		S-B-2
	5,0	S-C-1
		S-C-2
Cepa semi-industrial (ATCC 48272)	1,25	I-A-1
		I-A-2
	2,5	I-B-1
		I-B-2
	5,0	I-C-1
		I-C-2

Tabla 5.- Nomenclatura de los transformantes de *C. acremonium* empleados para estudiar su estabilidad y el destino del DNA transformante.

10. ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES.

Se extrajo el DNA total de los transformantes anteriormente mencionados (Tabla 5) y se hizo un análisis por el método de Southern. Con ello se pretendía comprobar que los individuos resistentes a fleomicina lo eran por haber adquirido el gen *Shble*, así como conocer el destino del DNA transformante.

Se usó 1 μg de DNA de cada transformante de acuerdo con la medida de densidad óptica a 260 nm. Se emplearon dos sondas distintas: 1) El fragmento *NcoI-HindIII* de 0,7 kb perteneciente al plásmido pUT713 (Fig. 8), que contiene el gen *Shble* y el terminador *CYC-1*. 2) El inserto del plásmido pAV4-1 (Figs. 12 y 14), es decir, un fragmento *SaII-EcoRI* de 1,4 kb que contiene el gen *pyr-4* de *C. acremonium* salvo los primeros tripletes de la zona 5' (los que intervienen en la fusión *pyr-4'::'Shble* de pFUN;

RESULTADOS

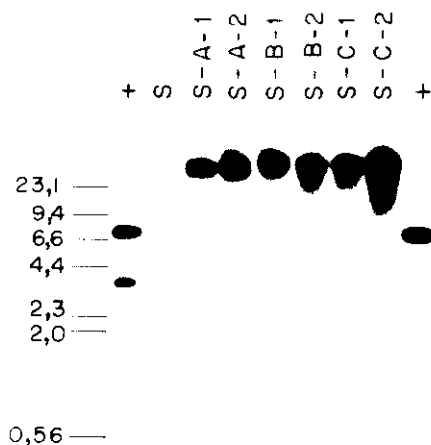


Fig. 28.- Análisis del DNA sin digerir de seis clones de *C. acremonium* ATCC 11550 transformados con el vector pFUN e hibridados con el gen *Shble*. Los carriles señalados con (+) son los controles positivos y contienen 0,3 ng de pFUN sin digerir (izquierda) o digerido con *EcoRI* (derecha). El resto de los carriles contienen 1 μ g de DNA de la cepa citada sin transformar (carril nombrado con la letra S) o transformados con pFUN, en cuyo caso el contenido sigue la nomenclatura señalada en la Tabla 5.

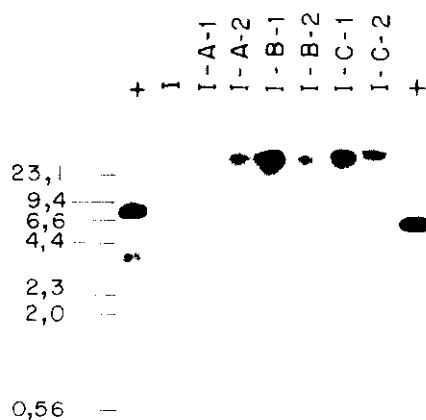


Fig. 29.- Análisis del DNA sin digerir de seis clones de *C. acremonium* ATCC 48272 transformados con el vector pFUN e hibridados con el gen *Shble*. La disposición de los carriles es equivalente a la de la figura anterior y sigue la nomenclatura de la Tabla 5. El carril nombrado con la letra I contiene 1 μ g de la cepa sin transformar.

ver la Fig. 25). Las hibridaciones se hicieron en primer lugar con la sonda del gen *Shble*. Después de revelar las autorradiografías con la primera sonda, se deshibridaron los filtros y se hibridaron con la sonda del gen *pyr-4*. La segunda hibridación tenía un objetivo triple: verificar que se había puesto una cantidad de DNA comparable en cada pocillo; comprobar que la digestión con enzimas de restricción no había sido parcial, en su caso; y detectar la posible presencia de polimorfismos entre las dos cepas empleadas.

El primer análisis consistió en hacer una hibridación entre el DNA extraído de los transformantes sin digerir con ninguna enzima y el gen *Shble*. En la Fig. 28 se muestra que el marcaje no aparece en la cepa silvestre sin transformar, pero que sí está presente en todos los transformantes analizados. Este hecho prueba que los transformantes han adquirido la capacidad de ser resistentes a fleomicina por haber incorporado el gen *Shble*. Además, la señal siempre aparece en el DNA de alto peso molecular, lo que sugiere que el vector pFUN se ha integrado en el genoma y que no se mantiene como plásmido libre. Una interpretación alternativa es que podría existir plásmido libre en multímeros que migrarían como el DNA genómico. Por último, no se observa una relación clara entre la intensidad de marcaje (que debe ser proporcional al número de copias del gen *Shble*) y la concentración de fleomicina con la que se seleccionaron los transformantes, a pesar de haber cargado una cantidad similar de DNA en cada pocillo.

Si se hace un estudio similar en la cepa semi-industrial C-10 (Fig. 29) se llega a las mismas conclusiones por lo que respecta a la presencia o ausencia del gen *Shble* en la cepa transformada o sin transformar y por lo que respecta a la hipótesis de transformación integrativa. Aunque tampoco parece que haya relación entre intensidad de marcaje y concentración de antibiótico con la que se seleccionaron los transformantes, puede apreciarse una diferencia notable entre el clon I-A-1 y el resto.

El segundo análisis consistió en el examen del DNA de los

RESULTADOS

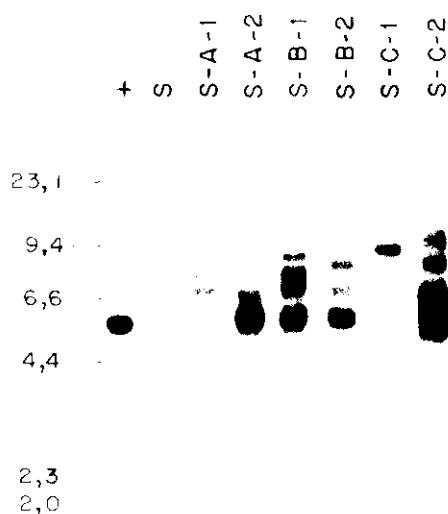


Fig. 30.- Análisis del DNA digerido con *EcoRI* de seis clones de *C. acremonium* ATCC 11550 transformados con el vector pFUN e hibridados con el gen *Shble*. El carril señalado con el signo (+) contiene 0,3 ng de pFUN digerido con *EcoRI*. El resto de las abreviaturas es idéntico al de la Fig. 28.

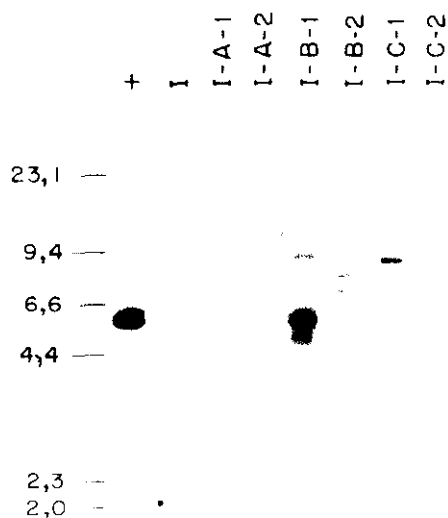


Fig. 31.- Análisis del DNA digerido con *EcoRI* de seis clones de *C. acremonium* ATCC 48272 transformados con el vector pFUN e hibridados con el gen *Shble*. El carril señalado con el signo (+) contiene 0,3 ng de pFUN digerido con *EcoRI*. El resto de las abreviaturas es idéntico al de la Fig. 29.

transformantes digerido con *EcoRI*. Este enzima corta una vez el vector pFUN, en la zona distal del promotor y en un lugar que no tiene correspondencia con el DNA genómico, puesto que procede de del arrastre de sitios únicos de clonación de pUC13 (ver la Fig. 24). El estudio con *EcoRI* confirma la ausencia de secuencias similares al gen *Shble* en la cepa sin transformar y pone de manifiesto que el patrón de integración del DNA transformante es complejo y con múltiples integraciones (Fig. 30). Aparecen dos tipos de intensidades en las bandas iluminadas. Las bandas poco intensas podrían corresponder a integraciones únicas o de pocas copias del vector con una migración similar dentro del rango de resolución de la electroforesis, o bien a las secuencias que flanquean una repetición en tándem. Las bandas más intensas, que tendrían del orden de 10 copias (individuos S-A-2, S-B-1, S-B-2 y S-C-2), podrían deberse a integraciones en tándem, puesto que migran como el plásmido lineal. Una integración del tipo I como la descrita en la Figura 5 de la Introducción (en la que la recombinación tendría lugar en la zona de homología entre el DNA genómico y el vector, es decir, dentro del fragmento en común del promotor *pyr-4* de 1,8 kb) debería dar lugar a una banda iluminada de 15,8 kb, según el mapa de la Fig. 12. Una banda de ese tamaño no aparece en ninguno de los transformantes de la Fig. 30. Por tanto, parece que la norma serían integraciones ectópicas en las que la recombinación se produciría entre pFUN y cualquier zona del genoma. El número de copias por individuo podría oscilar entre unas 5 (clon S-A-1) y aproximadamente 30 ó 40 (clon S-C-2), si bien estos valores no se han cuantificado mejor mediante autorradiografías de filtros con distintas cantidades de DNA frente a patrones (*dot blot*). El análisis con *EcoRI* confirma, al comparar parejas de transformantes obtenidos con la misma concentración de fleomicina, que no existe una relación precisa entre número de copias presentes y concentración de fleomicina empleada en la selección.

Lo expuesto con anterioridad también es válido para el análisis con *EcoRI* de los transformantes de la cepa C-10 (Fig.

RESULTADOS

31). En este caso sólo el individuo I-B-1 presenta copias en tándem que correspondan con el plásmido linealizado. El clon I-A-1 podría tener una sola copia del vector, resultado que corrobora la baja intensidad que presentaba en el análisis del DNA sin digerir (Fig. 29). La rehibridación del filtro con la sonda del gen *pyr-4* puso de manifiesto que no existe polimorfismo entre las dos cepas por lo que respecta a la digestión con *EcoRI*. En tal caso, una integración de tipo I debería dar lugar -como en el caso de la cepa silvestre- a una banda de 15,8 kb, hecho que no se produce en el clon I-A-1, pero que -dentro de los límites de resolución de la técnica- podría haber ocurrido en el individuo I-C-1 o I-C-2. Un análisis posterior con *XhoI*, que no corta en pFUN, mostró que tampoco existe polimorfismo con este enzima entre las dos cepas, corroboró la presencia de una sola copia en el individuo I-A-1 y descartó la posibilidad de integración de tipo I en los transformantes I-C-1 o I-C-2 (no se muestra). Por otra parte, se observa que el número de copias de vector integradas en los transformantes de la cepa C-10, que podría oscilar entre 1 y 20, es menor que en los transformantes de la cepa silvestre. Este hecho puede explicarse en parte porque en las transformaciones de la cepa C-10 se usaron siempre 10 µg de pFUN, mientras que todos los individuos analizados de la cepa silvestre proceden de transformaciones con 20 µg de vector.

Con este último apartado queda demostrado que se había desarrollado un procedimiento para introducir, mantener y expresar DNA en *C. acremonium*.

IV. DISCUSION

Con objeto de disponer de un gen homólogo y del metabolismo primario de *C. acremonium* para emplearlo en sistemas de transformación, se ha clonado el gen estructural que codifica para la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa de este hongo. Al gen clonado se le ha denominado *pyr-4*. El análisis de la secuencia permite distinguir las zonas promotora, estructural y terminadora, y su comparación con las de otras especies.

Se ha construido un vector para transformar protoplastos de la cepa silvestre de *C. acremonium* mediante una fusión traduccional entre el promotor más los tripletes del gen clonado y un gen que confiere resistencia a fleomicina. El sistema puesto a punto es el más eficaz de los descritos hasta el momento para esta especie y puede aplicarse a una cepa semi-industrial.

1. CLONACION DEL GEN *pyr-4* DE *C. ACREMONIUM*.

La ruta de biosíntesis de bases pirimidínicas es común en todas las especies en que se ha estudiado (Fig. 32). Consta de seis pasos y el primero de ellos es común a la síntesis de arginina, aunque está catalizado por enzimas específicas para cada ruta salvo en procariotas como *E. coli*. El último paso está catalizado por la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMPdecase; E.C.4.1.1.23) [236] para producir uridina 5'-monofosfato (UMP; Fig. 32). Esta enzima es homodimérica y citosólica en todos los organismos estudiados [cfr., p. ej., 50, 106, 197]. Existe una vía alternativa para obtener UMP, captando del medio nucleósidos o bases procedentes de la degradación de ácidos nucleicos por nucleasas extracelulares y el concurso de permeasas y kinasas o fosforribosil-transferasas en cada caso [ver, p. ej. 94, 207, 208, 320] (Fig. 33). A partir de UMP se incorporan dos grupos fosfato consecutivamente para producir uridina 5'-difosfato (UDP) y uridina 5'-trifosfato (UTP), punto

DISCUSION

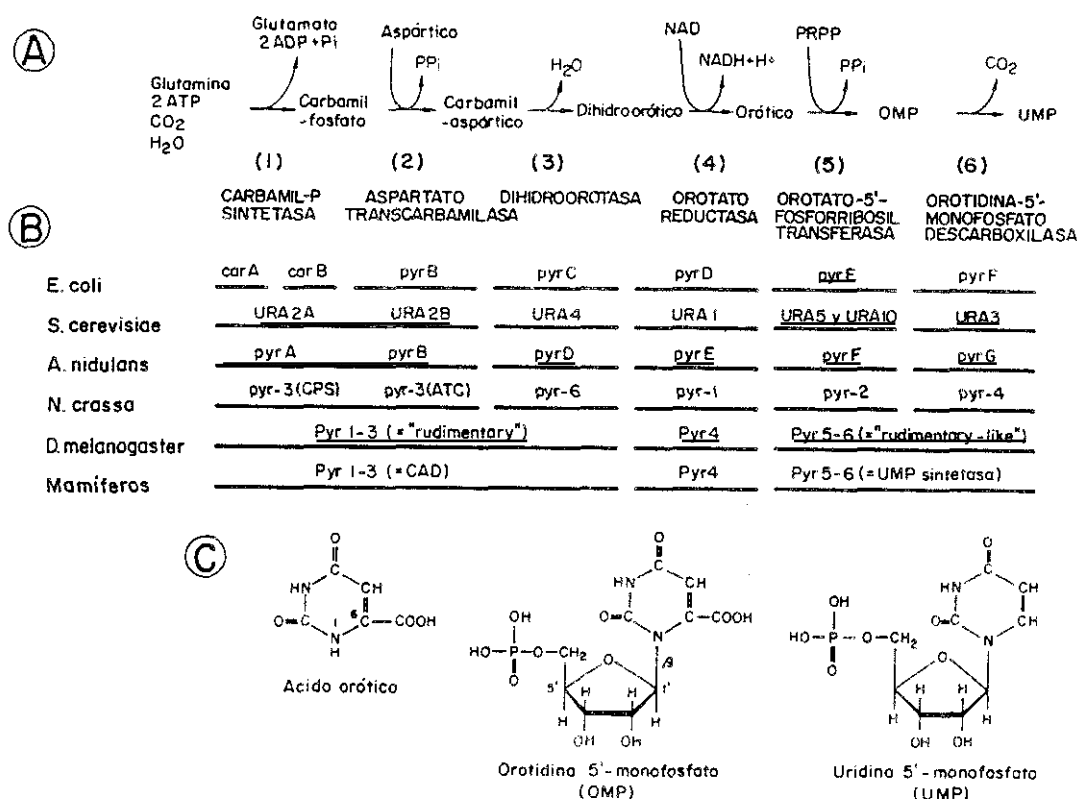


Fig. 32.- (A) Ruta de síntesis de novo de pirimidinas. (B) Genes estructurales correspondientes en varias especies. (C) Detalle de los tres últimos compuestos de la ruta. Modificado a partir de la referencia 49.

de partida en la incorporación de bases pirimidínicas a RNA y DNA [230].

En *B. subtilis* todos los genes para la biosíntesis de pirimidinas están agrupados [233] y en el resto de las especies estudiadas están dispersos por el genoma. La evolución tiende a seleccionar la fusión de estos genes en cistrones multifuncionales (Fig. 32), con la ventaja de la canalización (o secuestro) del sustrato. La canalización puede hacer que no se pierda energía por degradación del sustrato [197], que se mantenga el nivel de otro sustrato que interviene en la reacción [386] y es una forma de regular coordinadamente la síntesis de enzimas implicadas en varios pasos de una misma ruta metabólica [79]. Para justificar la fusión de genes también se ha apuntado

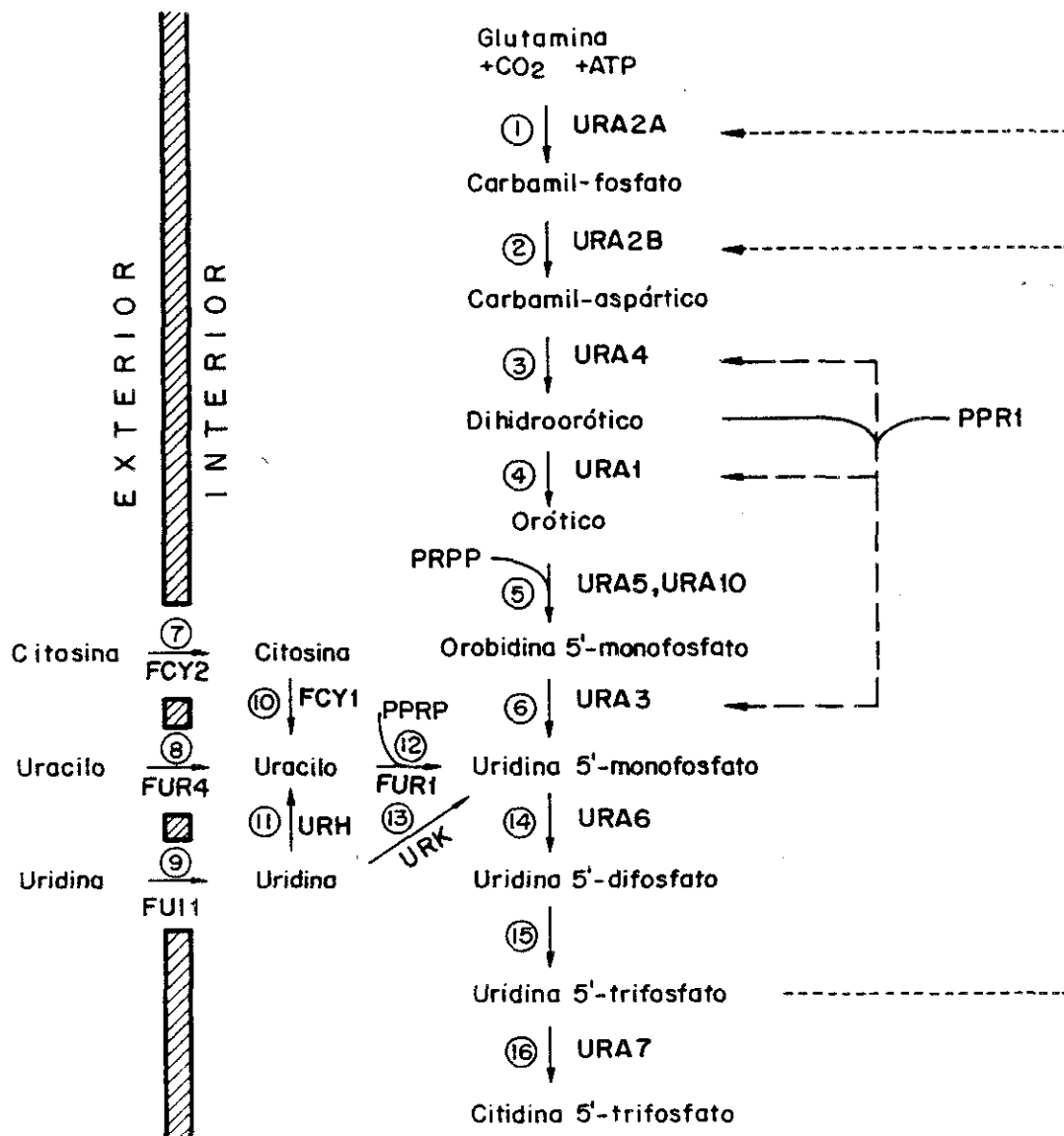


Fig. 33.- Regulación de la síntesis de pirimidinas en *S. cerevisiae*. Los pasos 1 al 6 se describieron en la Fig. 32. Los pasos 7, 8 y 9 corresponden a permeasas específicas. El resto de los pasos están catalizados por las siguientes enzimas: (10) citosina desaminasa; (11) uridina ribonhidrolasa; (12) uracilo fosforribosiltransferasa; (13) uridina quinasa; (14) uridina 5'-monofosfato quinasa; (15) uridina 5'-difosfato quinasa; (16) citidina 5'-trifosfato sintetasa. La línea de trazos largos indica inducción, y la línea de trazos cortos, represión y retroinhibición. PPR1 es el regulador positivo de la síntesis de pirimidinas. PRPP significa fosforribosil pirofosfato. Elaborado principalmente a partir de las referencias 95, 207, 227 y 289.

la hipótesis de que a medida que las células se hacen más complejas necesitan simplificar su genoma o reducir el número de partículas que requieren agua como solvente [261].

El eucariota en el que se ha estudiado mejor la regulación de estas rutas es en *S. cerevisiae* (Fig. 33) y en particular la regulación y la estructura del promotor del gen *URA3* [333]. La regulación del gen *URA3* se efectúa a nivel de transcripción [12] y es común a los genes *URA4*, *URA1* y *URA3* [241] (Fig. 33). En el mecanismo de regulación intervienen el regulador positivo *PPR1* y el ácido dihidroorótico como inductor [239]. El dominio de unión a DNA de *PPR1* tiene 6 residuos de cisteína con una estructura similar a la del regulador *GAL4* de levadura (*binuclear zinc cluster*) [201; cfr. también 53, 420 y la revisión 81]. La cantidad de mensajero de *URA3* sin inducir es la un gen de expresión media (~0,02% del total de RNA mensajero) [12]. La inducción aumenta el nivel 3-5 veces con respecto al nivel basal [241]. En *B. subtilis* [318], *E. coli* [389] y en *S. typhimurium* [377, 378] hay represión del transcrito por uracilo. En *N. crassa* también está demostrada la represión y retroinhibición de los dos primeros pasos de la ruta, así como la inducción por sustrato en *pyr-1* [320] (ver las Figuras 32 y 33). Se ha sugerido que el gen *pyr-4* de *N. crassa* tuviera la transcripción regulada por ácido dihidroorótico, como en el caso de levadura [137]. Una evidencia indirecta de la regulación del *pyrG* de *Ph. blakesleeana* es la cantidad de mensajero obtenida según el micelio estuviese crecido en medio mínimo o en medio rico [101]. Basándose en lo expuesto, puede proponerse que también el gen *pyr-4* de *C. acremonium* podría tener una expresión regulada en función de la concentración de pirimidinas o sus nucleósidos en el medio externo, aunque este hecho no se ha verificado experimentalmente.

En este trabajo se ha clonado el gen estructural que codifica para la OMPdecase de *C. acremonium*. En la actualidad este gen está clonado como mínimo en 29 especies y se conoce la secuencia en 21 de ellas (Tabla 6). Se puede afirmar que el gen clonado codifica para la OMPdecase basándose en los siguientes

CLONACION DEL GEN *pyr-4* DE *C. ACREMONIUM*

<u>ESPECIE</u>	<u>NOMBRE DEL GEN</u>	<u>REFERENCIA</u>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>pyrG</i>	283
<i>Aspergillus niger</i>	<i>pyrG</i>	144, 396, 413
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>pyrG</i>	96
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>pyrF</i>	233
<i>Candida albicans</i>	<i>URA3</i>	136, 240
<i>Candida boidinii</i>	<i>URA3</i>	334
<i>Claviceps purpurea</i>	<i>pyr-4</i>	361
<i>Cephalosporium acremonium</i>	<i>pyr-4</i>	400
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>pyrF</i>	235
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>r-1</i>	114
<i>Dictyostelium discoideum</i>	<i>DdPYR5-6</i>	47, 48
<i>Escherichia coli</i>	<i>pyrF</i>	105, 191, 389
<i>Homo sapiens</i>	<i>UMPs</i>	373, 374
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>URA3</i>	270, 353
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>pyrG</i>	33
<i>Mus musculus</i>	<i>ODC</i>	285
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>pyrF</i>	178
<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>uraA</i>	211
<i>Neurospora crassa</i>	<i>pyr-4</i>	57
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>pyrG</i>	63
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	<i>pyrG</i>	101
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>UMPs</i>	202
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>pyrF</i>	377
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>URA3</i>	12
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>URA1</i>	124
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>URA4</i>	13
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>ODC</i>	215
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>pyr-4/pyrG/ura3</i>	37, 152, 367
<i>Ustilago maydis</i>	<i>pyr6</i>	223

Tabla 6.- Genes estructurales para la OMPdecase clonados en distintas especies. Para las referencias de la secuencia de nucleótidos, consultar la Tabla 2 y el apartado 3.A de la sección de Resultados.

hechos:

- 1) Hibrida con el gen *pyr-4* de *N. crassa*.
- 2) Complementa la mutación *pyrF* de *E. coli*.
- 3) En maxicélulas expresa una proteína con un tamaño similar a la OMPdecase de *N. crassa*.
- 4) La secuencia de nucleótidos codifica para un polipéptido muy similar a las demás OMPdecasas conocidas, conservando las zonas características de estas enzimas.

Se demuestra que la hibridación heteróloga es una técnica válida para clonar genes en *C. acremonium*. Este método requiere cierta homología entre la sonda marcada y el gen que se quiere clonar, así como unas condiciones que permitan distinguir la hibridación entre los dos genes de señales inespecíficas. Se usó el gen de *N. crassa* como sonda porque, de entre los genes clonados al empezar este trabajo, la comparación de los RNA ribosómicos 5S situaba a *C. acremonium* próximo a *N. crassa* (clase pirenomicetos) [77, 174], una conclusión a la que no es fácil llegar por criterios morfológicos o fisiológicos. La importancia en la elección de la sonda se pone de manifiesto por el hecho de que el gen *trpC* de *P. chrysogenum* (clase plectomicetos) no hibrida con el gen de *C. acremonium* [341 y resultados que no se han mostrado]. Una vía alternativa era la clonación por complementación de la mutación *pyrF* de *E. coli* FB1009 con una genoteca de *C. acremonium* construida en plásmidos. Hubiera sido un camino más directo, pero presentaba el inconveniente *a priori* de que, si el gen hubiera tenido intrones, su desarrollo hubiera sido inviable. Los argumentos a favor de clonar el gen por hibridación eran que la técnica ya estaba puesta a punto [341] y que se disponía de una genoteca en fagos representativa del genoma de *C. acremonium* [291, 292]. La clonación del gen *pyr-4* de *C. acremonium* se empezó por las dos vías citadas y se concluyó antes por hibridación. A la vista del vigor mostrado por los transformantes de *E. coli* FB1009 con los plásmidos pAV1 o pAV2 hubiera sido difícil distinguir las colonias con el gen clonado de las colonias con crecimiento residual en los experimentos de

complementación. La complementación de la mutación *pyrF* fue muy útil, no obstante, para poder subclonar el gen aislado.

La complementación de una mutación de *E. coli* con un gen eucariota se ha hecho muchas veces en el pasado y desde la primera vez que se comunicó [371] se ha ilustrado en numerosas ocasiones, incluso en *C. acremonium* [122] o para clonar genes de otras OMPdecasas (consultar las referencias de la Tabla 6). La complementación de *E. coli pyrF* es la prueba genética formal de la identidad del gen clonado. También es un argumento importante para afirmar que el gen en cuestión no contiene intrones y así lo corrobora el análisis de su secuencia, aunque la prueba rigurosa debería aportarse mediante caracterización de cDNAs. Los genes equivalentes de los hongos próximos *N. crassa* y *T. reesei* tampoco tienen intrones, aunque los genes para las OMPdecasas de algunas especies sí los poseen, en posiciones conservadas según grupos filogenéticamente próximos (consultar las referencias que se dan en la Tabla 2). Además, la complementación de *E. coli pyrF* permite afirmar que se pueden eliminar los 8 primeros aminoácidos de la OMPdeca de *C. acremonium* sin que se afecte la actividad. Este hecho coincide con que se pueden delecionar los 6 primeros residuos de la proteína de *URA3* de levadura y de este modo utilizar el gen como indicador en estudios de expresión [4]. En la subclonación del gen *pyr-4* de *C. acremonium* se obtienen los plásmidos denominados pAV4-1 y pAV4-2 (Figs. 12 y 14), que podrían servir para el propósito mencionado. Ambos plásmidos poseen sitios únicos de clonación *HindIII*, *PstI*, *Sall* y *AccI* que provienen de pUC13 o de pUC12, respectivamente.

En el promotor y el terminador del gen clonado aparecen ciertos rasgos comunes (hipotéticos) con los de los genes equivalentes de *N. crassa* y *T. reesei*, con genes de *C. acremonium* y con secuencias de levadura y mamíferos (apartados 2.B y 2.C de Resultados). El significado de estas secuencias de regulación debería establecerse mediante análisis funcional y escapa del ámbito de este trabajo. El promotor es funcional en *E. coli* a pesar de que no se encuentran señales asimilables a las de un

promotor bacteriano. Esto justifica que la expresión en *E. coli* del gen clonado sea débil a pesar de residir en un plásmido multicopia, y explica la mejora obtenida cuando está dirigida por el promotor lac de pUC13, como en el caso de pAV4-1 (Figuras 12 y 14).

2. COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS.

El alineamiento de la proteína deducida por la secuencia del gen clonado frente a otras OMPdecasas muestra que se conservan todas las zonas típicas de estas enzimas (Fig. 19). El grado de similitud detectado permite clasificar a *C. acremonium* próximo a *N. crassa* y dentro del grupo de los pirenomicetos, lo que corrobora trabajos previos basados en el RNA 5S [77, 174]. Este hecho justifica también el nombre de *pyr-4* para el gen clonado, respetando la prioridad de nomenclatura de *N. crassa* [399, 400]. A la misma conclusión se llega en el caso de *T. reesei* con el gen equivalente, incluido también -como *C. acremonium*- en el grupo de los hongos imperfectos [367]. De entre los casos comparados, la mayor similitud aparece entre los genes y las proteínas de *C. acremonium* y *T. reesei*.

El motivo más conservado en las OMPdecasas de eucariotas muestra una correspondencia clara en procariotas con ciertas compensaciones de carga (Fig. 20). Dentro de este motivo conservado en eucariotas se observa que el péptido FEDRKF es idéntico en todas ellas y que no está interrumpido por intrones en sus secuencias nucleotídicas correspondientes. Aunque no se conoce la secuencia de ninguna OMPdecasa de grupos que hayan divergido entre hongos (en sentido amplio) y mamíferos, se considera que la separación entre ellos es anterior a la producida entre plantas y animales (Fig. 34). Por tanto, puede pensarse que el péptido FEDRKF se conserve, por ejemplo, en invertebrados o en plantas. Este hexapéptido permite diseñar un

COMPARACION CON OTRAS OMPDECASAS

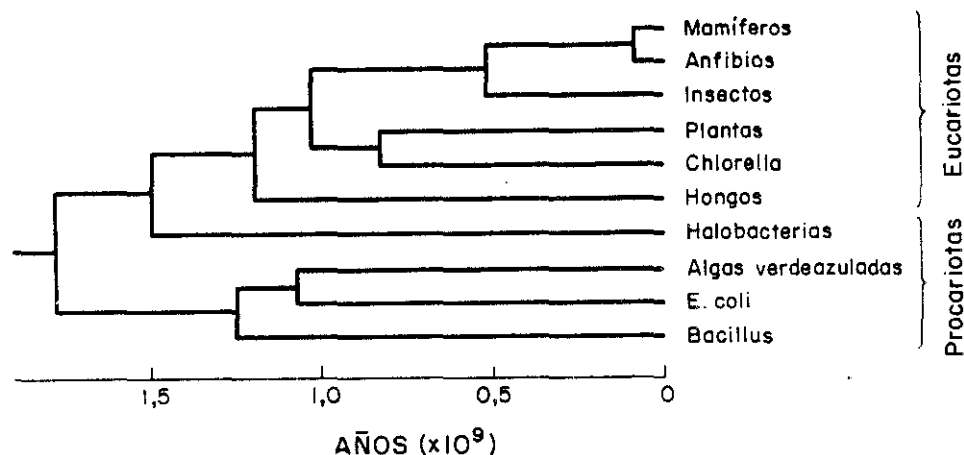


Fig. 34.- Evolución de varios grupos de especies según la secuencia del RNA ribosómico 5S. Tomado de Nei [278].

(A)	4 ^a .	5 ^a .	6 ^a .	7 ^a .	8 ^a .	9 ^a
(B)	F	E	D	R	K	F
(C)	TTC.	GAA.	GAC.	AGA.	AAA.	TT-
	C	G	T	C	C	G
(D)	100.	100.	100.	75.	100.	100

Fig. 35.- Sonda propuesta para clonar el gen estructural de la OMPdecasea en otros eucariotas. (A) Posición del aminoácido en el hexadecapéptido conservado (cfr. la Fig. 20). (B) Aminoácidos idénticos en eucariotas. (C) Secuencia del oligonucleótido degenerado. (D) Porcentaje de posibilidades de correspondencia entre aminoácido y triplete según el código genético.

oligonucleótido de 17 pb con 96 degeneraciones, que tendría como máximo una base desapareada en experimentos de hibridación con genotecas de cDNA o genómicas (Fig. 35). Tal oligonucleótido podría usarse como sonda para clonar el gen estructural de la OMPdecasea de otros eucariotas, usando compuestos como el cloruro de tetrametilamonio en la solución de hibridación [10, 336]. De hecho, oligonucleótidos similares han servido como apoyo [373]

o para corroborar la clonación de otros genes equivalentes [63, 114].

El dendrograma resultante de comparar todas las OMPdecasas (Fig. 21) tiene fallos y aciertos, como ya se ha comentado en la sección de Resultados. Aunque las conclusiones basadas en los cambios de un solo gen o una sola proteína deben tomarse con precaución [11], puede pensarse que el gen estructural que codifica para la OMPdecase está especialmente indicado para contribuir a los estudios de evolución molecular, puesto que, como se ha señalado hace poco [212]: 1) Todos los organismos tienen la misma ruta básica para sintetizar UMP y por tanto deben poseer actividad OMPdecase. 2) Todos los organismos estudiados hasta ahora tienen un gen único que codifica para tal actividad. 3) Todo parece indicar que los genes actuales proceden de un mismo ancestro común. 4) El gen se puede clonar de forma relativamente sencilla por métodos convencionales (Tabla 6) o mediante el uso de la sonda sintética propuesta (Fig. 35) en el caso de eucariotas.

3. TRANSFORMACION DE *C. ACREMONIUM*.

3.A. Ausencia de mutantes *pyr-4*.

Se ha puesto a punto un procedimiento para obtener mutantes auxótrofos de *C. acremonium* ATCC 11550 por tratamiento mutagénico y enriquecimiento por filtración. El método da unos resultados comparables a los descritos en *A. niger* [58] o *T. reesei* [297] en cuanto al aislamiento de mutantes bloqueados en la ruta de síntesis de arginina o de triptófano. Sin embargo, no sirvió para aislar mutantes *pyr-4*, aún usando el ácido 5-fluororótico (FOA). Por tanto, no se ha podido elaborar un sistema de transformación por complementación con el gen clonado, tal como se apuntó en la Introducción (Fig. 7).

Con el FOA se ha conseguido la selección preferente de estirpes con mutaciones de pérdida de función en el gen estructural de la OMPdecase y en el gen estructural que codifica para la enzima del paso anterior (orotato 5'-fosforribosil transferasa, EC. 2.4.2.10; ver la Fig. 32) en distintas especies. La aplicación de este compuesto se comunicó inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* [41]. Con posterioridad ha resultado ser muy útil para seleccionar mutaciones de los dos tipos citados empleando tratamientos mutagénicos convencionales. Mediante el FOA se han podido aislar auxótrofos afectados concretamente en el gen de la OMPdecase de varias especies de microorganismos: *Aspergillus flavus* [415], *A. niger* [44, 45, 144, 396], *A. oryzae* [96, 258], *Candida albicans* [205], *Candida boidinii* [334], *Claviceps purpurea* [361], *Mucor circinelloides* [33], *Penicillium chrysogenum* [102], *Sulfobolus acidocaldarius* [218], *Trichoderma reesei* [37, 151, 152, 367], *T. viride* [78] y *Ustilago maydis* [223].

En la mayoría de los casos mencionados se han establecido sistemas de transformación por complementación de la auxotrofía con genes homólogos o heterólogos (Tabla 7). A la vista de la Tabla se observa la flexibilidad en el uso del marcador heterólogo, por lo que el gen *pyr-4* de *C. acremonium* podría servir para transformar los mutantes correspondientes de alguna de las especies citadas.

Por medio del FOA también se han llevado a cabo sustituciones génicas y otras manipulaciones en *A. nidulans* [110], *Myxococcus xanthus* [211], *S. cerevisiae* [revisado en 42, 330] y *U. maydis* [223]. Es de especial interés la obtención del auxótrofo receptor con técnicas de DNA recombinante y transformación -una vez clonado el gen homólogo y usando FOA-, lo que se ha logrado en *C. albicans* [205, 206], *Dictyostelium discoideum* [200], *Mycobacterium smegmatis* [178], *S. cerevisiae* [42, 214] y *Sch. pombe* [150].

El mecanismo por el que actúa el FOA no está muy estudiado

DISCUSION

<u>ESPECIE RECEPTORA</u>	<u>GEN MARCADOR</u>	<u>REFERENCIAS</u>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus niger</i>	408
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	415
<i>Aspergillus nidulans</i>	Homólogo	283
	<i>Aspergillus niger</i>	396
	<i>Neurospora crassa</i>	20, 21
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	63
<i>Aspergillus niger</i>	Homólogo	144, 396
	<i>Aspergillus oryzae</i>	96
	<i>Claviceps purpurea</i>	361
	<i>Neurospora crassa</i>	396, 408
<i>Aspergillus oryzae</i>	Homólogo	96
	<i>Aspergillus niger</i>	258
<i>Candida albicans</i>	Homólogo	205
<i>Candida boidinii</i>	Homólogo	334
<i>Claviceps purpurea</i>	Homólogo	361
	<i>Aspergillus niger</i>	361
	<i>Neurospora crassa</i>	361
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Homólogo	200
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Homólogo	353
<i>Mucor circinelloides</i>	Homólogo	33
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Homólogo	178
<i>Neurospora crassa</i>	Homólogo	57
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Homólogo	63
	<i>Neurospora crassa</i>	62, 102
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Homólogo	46, 135
	<i>Candida albicans</i>	136
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	48, 49
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	353
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	13
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	215
	<i>Ustilago maydis</i>	223
<i>Schizophyllum commune</i>	Homólogo	124, 125
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Homólogo	13, 149, 150
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
<i>Trichoderma reesei</i>	Homólogo	37, 152, 367
	<i>Aspergillus niger</i>	151
	<i>Neurospora crassa</i>	37, 151
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Neurospora crassa</i>	78
<i>Ustilago maydis</i>	Homólogo	223

Tabla 7.- Microorganismos transformados por complementación con el gen estructural de la OMPdecase.

y es posible que se deba a la formación de 5-flúor-UMP y posterior reducción a 5-flúor-dUMP, compuesto que inhibe irreversiblemente la timidilato-sintetasa [41, 200, 326]. La ausencia de mutantes *pyr-4* en *C. acremonium* podría tener varias explicaciones, entre otras:

1) Aunque se anule la función del gen *pyr-4*, puede existir otra enzima capaz de suplir esta actividad [117]; o bien existe redundancia genética, como en el caso de los genes *URA5* y *URA10* de levadura [95] (Fig. 33).

2) La mutación se produce con mayor probabilidad en otro gen antes que en el gen *pyr-4*, ya que no todos los mutágenos actúan igual ni con la misma intensidad en todas las zonas del genoma [117, 172]. Los mutantes protótrofos y resistentes al FOA aislados de *C. acremonium* podrían estar afectados en los genes que codifican para las proteínas implicadas en la recuperación de pirimidinas del medio externo (permeasas, fosforribosil-transferasas), suponiendo que el FOA penetrase en la célula por esta vía, dada su similitud estructural. De hecho, la resistencia a fluoropirimidinas es un criterio para caracterizar mutaciones en la vía de recuperación mencionada tanto en *S. cerevisiae* [94, 198, 207, 208] como en *N. crassa* [55, 56, 320].

3) El razonamiento opuesto: el gen *pyr-4* de *C. acremonium* podría encontrarse en una zona en la que se producen las mutaciones fácilmente, y al trabajar con índices de supervivencia bajos (1-15%) se está forzando la aparición de mutantes auxótrofos dobles que no se recuperarían o se perderían en los pasos posteriores de caracterización. En *A. niger*, el mayor rendimiento en mutantes auxótrofos simples se consigue con índices de supervivencia del 70-80 % [43, 45].

4) La mutación en el gen *pyr-4* no resistiría el ayuno en pirimidinas que se produce en los experimentos de enriquecimiento por filtración, como ocurre con otras auxotrofías [117].

Aunque el protocolo desarrollado para aislar mutantes auxótrofos en la ruta de síntesis de arginina o triptófano es aceptable, la comprobación posterior es un requisito esencial,

ya que el método de enriquecimiento por filtración es también una forma de seleccionar esporas retrasadas en la germinación [117]. Los mutantes obtenidos mostraron en general escaso vigor en el crecimiento y poca esporulación, lo que podría indicar que están afectados en otros loci además de en el de la mutación caracterizada o que la mutación tiene efectos pleiotrópicos. En *A. nidulans* está descrita la influencia negativa de las mutaciones en la ruta de síntesis de arginina sobre la germinación y la esporulación [348], y en *A. nidulans* y *A. niger*, el efecto negativo de la mutación *trpC* sobre el crecimiento y la esporulación [145, 418]. Si las estirpes auxótrofas obtenidas tienen unas mutaciones sin efecto pleiotrópico, el vigor y capacidad de esporulación normal se podrían restablecer retrocruzándolas con la cepa silvestre o con otros mutantes auxótrofos mediante fusión de protoplastos [296].

En cualquier caso, los mutantes obtenidos -u otros que se pudieran aislar con el método puesto a punto- podrían utilizarse de dos maneras: como receptores en sistemas de transformación que empleasen genes heterólogos de marcadores; o para clonar los genes homólogos correspondientes de *C. acremonium*, según se discutirá en el apartado 3.E. En relación con el último objetivo mencionado, tiene especial interés la clonación de los genes implicados en las rutas sintéticas de aminoácidos, cisteína y valina, que son los precursores del tripéptido del que derivan los antibióticos β -lactámicos (Fig. 3).

La ausencia de mutantes *pyr-4*, junto con las ventajas apuntadas en la Introducción por lo que se refiere a aplicación industrial, hizo continuar el trabajo hacia el establecimiento de un sistema de transformación y selección por resistencia usando el promotor del gen clonado.

3.B. Transformación por resistencia a fleomicina.

Las fleomicinas son antibióticos metaloglucopeptídicos relacionados con bleomicinas y talisomicinas, todas ellas producidas por *Streptomyces verticillius* [34, 376]. Fleomicinas y bleomicinas muestran amplio espectro frente a bacterias, levaduras, hongos filamentosos y células de animales y plantas en concentraciones de 0,1-50 µg/mL. El efecto de estos antibióticos varía según el grupo básico sustituyente [83, 148]. Las bleomicinas perturban la membrana plasmática, aunque existe gran apoyo experimental para afirmar que su mayor efecto se debe a la capacidad que tienen de intercalarse en el DNA y producirle roturas cuando están activadas por hierro en presencia de oxígeno [cfr., p. ej., 199, 209, 224, 390]. La fleomicina empleada en este trabajo es fleomicina D1 quelada con cobre y en forma de clorhidrato, en donde la amina terminal sustituyente es agmantina (Fig. 9).

Existen tres genes que producen resistencia a fleomicina o bleomicina: en la región central del transposón Tn5 de bacterias gramnegativas [83, 134, 260]; en el plásmido pUB110 de bacterias grampositivas [347]; y en el genoma de *Streptoalloteichus hindustanus* (gen *Shble*), un actinomiceto productor de talisomicina y con resistencia natural a fleomicina [108]. En este trabajo se ha usado el gen *Shble*. Los tres genes codifican para proteínas pequeñas (13-15 kDa) que tienen zonas de homología común [131, 347]. La proteína codificada por el gen *Shble* se une a bleomicina en proporción molar 1:1, con lo que el antibiótico no puede reaccionar *in vitro* con el DNA [131]. Este dato puede explicar que una mayor cantidad de proteína codificada por los genes *ble* aumente el nivel de tolerancia a fleomicina o bleomicina [132].

El hecho de que muchos organismos sean sensibles a bleomicina o fleomicina y la disponibilidad de genes de resistencia frente a ellas ha servido para transformar (trans-

DISCUSION

<u>GEN DE RESISTENCIA</u>	<u>ESPECIE</u>	<u>REFERENCIAS</u>
pUB110ble	<i>Escherichia coli</i>	347
Tn5ble	<i>Agrobacterium tumefaciens/Nicotiana plumbaginifolia</i>	170
	<i>Agrobacterium tumefaciens/Nicotiana tabacum</i>	308
	<i>Aspergillus nidulans</i>	9, 395
	<i>Aspergillus niger</i>	395
	<i>Aspergillus oryzae</i>	74
	Células de ovario de hámster	274
	<i>Claviceps purpurea</i>	395
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	70
	<i>Escherichia coli</i>	130, 134
	<i>Neurospora crassa</i>	9
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	217
	<i>Penicillium roqueforti</i>	113
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130, 132
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	226
	<i>Tolypocladium geodes</i>	60
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	128
Shble	<i>Agrobacterium tumefaciens/Nicotiana tabacum</i>	308
	<i>Aspergillus nidulans</i>	259
	<i>Aspergillus niger</i>	259
	<i>Aspergillus oryzae</i>	259
	Células embrionarias de pollo (ALV)	87
	Células de ovario de hámster	274
	<i>Cephalosporium acremonium</i>	31, 255
	<i>Escherichia coli</i>	26
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	31, 66, 328, 398
	<i>Talaromyces</i> sp.	187
	<i>Tolypocladium geodes</i>	26, 27, 60, 61
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	138
	<i>Trichoderma reesei</i>	112, 335
	<i>Trypanosoma brucei</i>	190

Tabla 8.- Especies transformadas (transfectadas) o cotransformadas por resistencia a bleomicina o fleomicina. Los sistemas de *C. acremonium* se discuten con más detalle en el apartado 3.C.

fectar) o cotransformar muchas especies (Tabla 8). En todos los sistemas citados los genes *ble* se han puesto bajo el control de un promotor homólogo o heterólogo de alguna especie evolutivamente próxima, en ocasiones clonado como aplicación del propio sistema de transformación [132, 187, 226]; y en general un terminador de transcripción, normalmente heterólogo. A partir de las referencias de la Tabla 8 puede hacerse la generalización de que suelen obtenerse mejores resultados con fleomicina que con bleomicina, con el gen *Shble* en lugar del *Tn5ble* y con elementos reguladores homólogos. En los trabajos en que se ha estudiado, se establece que la toxicidad del antibiótico es menor a pH ácido; con fuente de carbono fácilmente asimilable; con fuente de nitrógeno represora; en medios complejos; con presión osmótica alta; con tiempos de regeneración largos hasta que se añade la droga; con alta densidad de plaqueo; y en ausencia de compuestos heterocíclicos y aromáticos como la cafeína.

Las dos estirpes de *C. acremonium* empleadas en este trabajo se mostraron sensibles a fleomicina. Por medio de una fusión traduccional entre el promotor con los primeros tripletes del gen clonado y el gen *Shble* se construyó un vector, denominado pFUN, que permite una selección limpia en experimentos de transformación (Tabla 4). Se puede afirmar que las colonias resistentes a fleomicina obtenidas en las transformaciones son verdaderos transformantes debido a tres hechos:

1) En las placas sin DNA transformante (sin gen *Shble*) no aparecen resistentes espontáneos.

2) Cuando los protoplastos se incuban con el gen *Shble* aparecen colonias resistentes a fleomicina. La frecuencia con la que aparecen estas colonias es baja cuando se transforma con el gen *Shble* sin señales que permitan su transcripción y traducción, y alta cuando estas señales son las apropiadas para una expresión correcta.

3) En el DNA extraído de los transformantes analizados hay secuencias que hibridan con el gen *Shble*, mientras que en las estirpes sin transformar no hay hibridación con dicha sonda.

Los transformantes estudiados de ambas cepas son muy estables a escala de laboratorio (apartado 9 de Resultados). El análisis por el método de Southern indica que el DNA transformante se integra en el genoma, lo que es coherente con la estabilidad mostrada. El número de copias por clon oscila entre 1 y aproximadamente 30, integradas ectópicamente y en ocasiones en tándem (apartado 10 de Resultados). Este patrón de integración es frecuente en hongos filamentosos [118, 322], incluso en *C. acremonium*, como se verá en el siguiente apartado. Aparentemente no hay relación entre el número de copias por transformante y la concentración de fleomicina empleada en la selección. Esto sugiere que el número de copias de la fusión *pyr-4'::'Shble* no es limitante en estas condiciones, quizá debido a que se produce una expresión eficaz de la fusión mencionada.

Como se señaló en la Introducción, el hecho de que se puedan obtener transformantes con una sola copia permitiría hacer estudios de regulación. La obtención de transformantes con múltiples copias es importante en la construcción de cepas industriales -al poder amplificar los genes responsables de la superproducción- y para titular elementos reguladores que actúen en *trans*. Desde el punto de vista industrial es preferible que los transformantes integren el vector, ya que, dada la estabilidad mitótica que de ello se deriva, no es necesario mantener presión selectiva en los fermentadores, lo que sería antieconómico. Sin embargo, el que existan varias copias adyacentes de vector supone una tendencia a que se produzca recombinación entre ellas por medio de sus zonas homólogas, con lo que se escinden secuencias del DNA transformante [118]. La situación más estable parece ser la de los transformantes con una única copia integrada en posición ectópica [204, 247]. La estabilidad en mayores volúmenes de cultivo debería estudiarse en el futuro. Se ha comunicado la estabilidad de transformantes de *C. acremonium* a escala de 150 L [359] y de *P. chrysogenum* a escala de 5 L [327].

3.C. Comparación del procedimiento desarrollado con otros sistemas de transformación de *C. acremonium*.

En la actualidad hay varios sistemas para transformar *C. acremonium*: 1) Por resistencia a higromicina B. 2) Por resistencia a G418. 3) Por resistencia a fleomicina. 4) Por complementación de una mutación en la ruta de asimilación del nitrógeno con el gen homólogo *niaD*.

1) El sistema original de transformación por resistencia a higromicina B [71, 72, 315] -y del que se trató en el apartado 5 de la Introducción- se mejoró principalmente al poner el gen que confiere la resistencia a dicho antibiótico (HPT) bajo el control del promotor homólogo del gen *pcbC* [73, 179, 356, 357], en lugar del promotor de levadura que usaba en un principio. Mediante ésta y otras modificaciones se llegó a obtener una frecuencia media (con gran oscilación) de 20 transformantes/ μ g de DNA. Los mismos autores han transformado posteriormente *C. acremonium* por resistencia a higromicina B usando el promotor homólogo del gen *LEU2* y por resistencia a fleomicina usando el promotor homólogo del gen *pcbC*, pero no mencionan datos concretos sobre la frecuencia obtenida en cada caso, ni siquiera el gen específico empleado que confiere resistencia a fleomicina [175].

Otros autores que emplearon la selección por resistencia a G418 sin usar ningún promotor eucariota ([182]; ver más adelante), tampoco han comunicado resultados concretos propios de la transformación cuando han empleado el promotor y el terminador del gen homólogo que codifica para la proteasa alcalina en la transformación por resistencia a higromicina B [185].

Un sistema más reciente que también se basa en la resistencia a este antibiótico logra 6 transformantes/ μ g de DNA usando el promotor homólogo del gen *pcbC*, y 12 transformantes/ μ g de DNA usando el promotor (fuerte) del gen *gpdA* de *A. nidulans*. En este último caso aparecen 200-2.000 transformantes

abortivos/ μ g de DNA [364].

2) El primer sistema descrito para seleccionar por resistencia a G418 empleaba el gen correspondiente del Tn903 [298-300], y se trató de él en la Introducción. Otro sistema que también emplea el gen y el método de selección citado -sin el concurso de ningún promotor eucariota- no supera en general los 3 transformantes/ μ g de DNA, ya que disminuyendo la concentración de G418 se consigue mayor frecuencia, pero con aparición de resistentes espontáneos en las placas de control sin DNA [182].

3) Además del sistema mencionado en 1) para transformar *C. acremonium* por resistencia a fleomicina, existen otros dos sistemas indirectamente comunicados que operan de modo similar. En uno de ellos se emplea una fusión transcripcional entre el promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y el gen *Shble*, y presenta una frecuencia de 10-15 transformantes/ μ g de DNA [31, 155-157]. En el otro sistema se usa una fusión transcripcional entre el promotor del gen homólogo *pcbC* y el gen *Shble* [255].

4) Por último, el sistema que emplea la complementación de mutantes con el gen homólogo *niaD* llega hasta 40 transformantes/ μ g de DNA como máximo. Tiene la ventaja de que las mutaciones hipofuncionales en el gen estructural que codifica para la nitrato reductasa aparecen espontáneamente con una frecuencia elevada. Además, las cepas portadoras de tales mutaciones se pueden seleccionar positivamente por resistencia a clorato. En el mismo trabajo se cotransforma con el gen *tub-2* de *N. crassa* y los cotransformantes se identifican por resistencia a benomilo [412].

En los procedimientos citados se manejan generalmente unas cantidades similares de DNA y un número igual o mayor de protoplastos, por lo que los resultados se pueden comparar de forma aproximada con los de este trabajo. Todos los sistemas descritos usan medios complejos en la regeneración y selección de protoplastos, salvo el sistema de complementación con *niaD*. La norma en todos ellos es que la transformación es integrativa, casi siempre con varias copias en posición ectópica y en

ocasiones repetidas en tándem. En el sistema que emplea *niaD* aparecen, además, integraciones simples y homólogas de tipo I y III como se describió en la Introducción (Fig. 5).

El sistema desarrollado en este estudio es el más eficaz de los descritos hasta el momento para *C. acremonium*, ya que llegan a obtenerse hasta cerca de 100 transformantes/ μg de DNA, como media (Tabla 4). Además, no aparecen resistentes espontáneos y la frecuencia de transformantes presuntamente abortivos es insignificante. Supuso desarrollar un método distinto a los descritos en esta especie para obtener y transformar protoplastos, que es muy repetible en la cepa silvestre posiblemente por partir de cultivos homogéneos (apartados 7 y 8 de Resultados). Hay que tener en cuenta que en la transformación de hongos filamentosos y levaduras es fácil tener variaciones de un orden de magnitud en los resultados de un experimento a otro.

El procedimiento es más sencillo que la mayoría de los protocolos de obtención de protoplastos de *C. acremonium* al no requerir, por ejemplo, un pretratamiento del micelio con agentes reductores como ditiotreitól o β -mercaptoetanol, incubaciones con más de una enzima o tiempos largos de incubación en mezcla lítica. La obtención y transformación propiamente dichas de $\sim 10^9$ protoplastos puede hacerse fácilmente en 4-5 horas de trabajo, con lo que se consiguen 20.000-25.000 transformantes en total a partir de 1 g de micelio y $\sim 250 \mu\text{g}$ de vector pFUN. Aún en las condiciones en que se logra la frecuencia máxima, la cantidad de DNA está limitando el número de transformantes que podrían obtenerse. El protocolo se puede aumentar de escala fácilmente 2-4 veces. Presenta la ventaja adicional de que la manipulación se hace en medios mínimos, lo que facilita la reproducibilidad y las posibles alteraciones futuras para llevar a cabo estudios de regulación o trabajar con estirpes portadoras de mutaciones de auxotrofia, por ejemplo. El uso de medios mínimos, además, disminuye la posibilidad de aparición de clones transformantes que, seleccionados en medio rico, pudieran llevar alguna copia del vector inactivando algún gen esencial.

El sistema puesto a punto podría aplicarse a otras cepas de *C. acremonium*, estableciendo previamente el rango de resistencia a fleomicina en cada caso. Se demuestra que el método desarrollado para la estirpe silvestre (ATCC 11550) se puede aplicar directamente a la cepa semi-industrial C-10 (ATCC 48272). Los resultados de frecuencia de transformación obtenidos con la cepa C-10 son algo inferiores en comparación con la cepa silvestre, lo que podría indicar que estirpe semi-industrial fuese más sensible a fleomicina. También las cepas industriales de *C. acremonium* son más sensibles a higromicina B que la cepa silvestre [359]. El hecho de que el sistema fuese válido para cepas industriales de *C. acremonium*, en las que la fermentación a gran escala es posible, sugiere la posibilidad de producir, por ejemplo, péptidos heterólogos con interés clínico [120, 393].

El vector pFUN también se podría emplear para transformar otras especies de hongos. Estaría particularmente indicado en el caso de *T. reesei*, debido a: 1) La proximidad filogenética mostrada en este trabajo. 2) Las señales comunes detectadas en los promotores de los dos genes *pyr-4*. 3) La identidad de aminoácidos en el extremo N-terminal de sus respectivas OMPdecasas que intervienen en el vector citado.

El motivo por el que el sistema desarrollado en este estudio es más eficaz que los descritos hasta la fecha debe atribuirse al desarrollo del plan propuesto, es decir: el uso de una fusión traduccional en la que la expresión de resistencia está modulada por un promotor homólogo, del metabolismo primario, en medio mínimo y tras un tiempo de regeneración de los protoplastos sin presión selectiva. De este modo se asegura la expresión correcta del gen de resistencia en los protoplastos que han captado el DNA desde etapas tempranas de su regeneración en placa. Como se apuntó al principio de esta Discusión, puede pensarse que la máxima expresión del gen *pyr-4* de *C. acremonium* ocurra en ausencia de pirimidinas. Por otra parte, el patrón de expresión del gen equivalente *Ddpyr5-6* de *D. discoideum* es de máxima transcripción durante el crecimiento y mínima durante la

diferenciación, manteniéndose la actividad enzimática por la propia estabilidad de la proteína. Se ha postulado que este modelo pueda ser general para genes domésticos o constitutivos (*house-keeping*) frente a genes más especializados [116]. Lo contrario ocurre con el gen *pcbC*, implicado en el metabolismo secundario, ya que su transcripción comienza preferentemente en fases tardías [304, 362] y además está sujeta a represión por catabolito [115]. Por tanto, el uso del promotor homólogo o heterólogo del gen *pcbC* -tan extendido en los vectores de transformación por resistencia para *C. acremonium*-, parece estar menos indicado que el promotor del gen *pyr-4*, y obedece simplemente a su disponibilidad conyuntural. Además, las presumibles características del promotor del gen *pyr-4* en cuanto a mostrar su máxima expresión en etapas tempranas y en ausencia de compuestos represores podría aumentar la recombinación del vector con el genoma [379]. Por último, el añadir el antibiótico tras un tiempo de recuperación, superior al de la fase de latencia que se pudiera producir en los protoplastos al empezar a regenerar y germinar en placa, disminuye la posibilidad de desestabilizar las membranas o de causar mutaciones en el genoma de los protoplastos receptores por la acción de la fleomicina.

Por otro lado, en la transformación se utiliza una solución de PEG en un volumen igual al de la suspensión de protoplastos. La norma suele ser añadir un volumen 10 veces mayor de solución de PEG que de suspensión de protoplastos. Esta cantidad, sin embargo, es suficiente para permitir la agregación mayoritaria de los protoplastos, como se observó por microscopía. El usar poco volumen de solución con PEG implica, principalmente: 1) Que existe mayor probabilidad de interacción entre los protoplastos y el DNA transformante, por ser mayor la concentración. De hecho, una de las formas de aumentar la frecuencia de transformación modificando el protocolo original de transformación por resistencia a higromicina B en *C. acremonium* fue precisamente incubar los protoplastos con mayor cantidad de DNA y menor volumen de solución con PEG [356, 357]. 2) Que no haya un

descenso grande de presión osmótica, lo que produciría lisis. La viabilidad de los protoplastos en el método desarrollado en este trabajo no varía significativamente antes y después del tratamiento con PEG. El fenómeno observado de lisis por descenso de presión osmótica y su corrección sirvió para mejorar sustancialmente la frecuencia inicial de transformación de *A. nidulans* [21, 283].

3.D. Mejoras futuras.

La frecuencia de transformación se podría aumentar basándose en modificaciones que han dado buen resultado en otros sistemas. Estas mejoras son importantes para la explotación de posibilidades concretas que se discutirán en el próximo apartado, y pueden mencionarse las siguientes:

1) **Aumento de viabilidad de los protoplastos.** En *C. acremonium*, cuando se aumenta la proporción de protoplastos voluminosos por medio de una centrifugación a baja velocidad, aumenta su viabilidad y la frecuencia de transformación, ya que los protoplastos inviables (más pequeños) no compiten con los viables en la captura del DNA transformante [356, 357]. Por tanto, de este modo no se aumentaría el número total de transformantes que se obtiene por unidad de peso de micelio, pero para obtener un mismo número de transformantes sería necesaria menor cantidad de DNA (aproximadamente la mitad, según se deduce de los trabajos citados), lo que sería importante en transformaciones con genotecas.

Es posible que un estudio sistemático de las variables implicadas en la liberación y regeneración de protoplastos permitiera aumentar su rendimiento por unidad de peso de micelio y su viabilidad [91, 402]. La alteración de una variable podría obligar a modificar otras. Por ejemplo, en la transformación por

resistencia a bleomicina de *Claviceps purpurea* se aumentó la viabilidad media de los protoplastos de un 5% a un 70% cambiando el pH de regeneración de las placas de 8,0 á 5,2 [395]. Puesto que la sensibilidad a fleomicina depende del pH, en caso de introducir tal mejora habría que volver a determinar la concentración óptima de antibiótico que debe usarse en la selección.

2) **Incubación de la reacción de transformación.** Ejemplos de modificaciones que han aumentado la frecuencia de transformación aplicados a la mezcla de protoplastos con DNA y solución con PEG son, según los casos, la incubación en hielo [370], el choque térmico [35] o la adición de DNA distinto del marcador para proteger al DNA transformante de la degradación por nucleasas o de la captura por protoplastos inviables [8]. Particularmente interesante es la adición de ácido aurintricarboxílico, un inhibidor de nucleasas que aumenta la frecuencia de transformación con DNA lineal hasta 500 veces en *P. chrysogenum* [323] y 2-5 veces con plásmido circular en *A. awamori* [408].

3) **Cambio del terminador de transcripción.** El plásmido pFUN lleva el terminador del gen *CYC-1* de levadura. Generalmente se acepta que las señales de terminación pueden funcionar en distintas especies de eucariotas. Sin embargo, en la transformación de *Tolypocladium geodes* con el gen *Shble*, se aumentó 2-5 veces la frecuencia de transformación al sustituir el terminador *CYC-1* de levadura por el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* [60]. El vector pUT715 [60, 187] lleva el último terminador mencionado, y la construcción a partir de pFUN podría hacerse de forma inmediata. También sería de interés incluir el propio terminador del gen *pyr-4* de *C. acremonium*. Hay que señalar, no obstante, que los intentos equivalentes con el terminador del gen homólogo *pcbC* no han dado resultado positivo en *C. acremonium* [357, 364].

Por otra parte, una modificación necesaria -sin relación con

la frecuencia del sistema- es la sustitución del marcador procariota de pFUN. Este plásmido se selecciona y amplifica en *E. coli* por ser resistente a ampicilina, ya que lleva el gen de la β -lactamasa. Aunque no es probable que las señales procariotas sean funcionales en *C. acremonium*, el hecho de que los transformantes tengan el vector integrado ectópicamente, puedan llevar decenas de copias del vector o que las copias se pudieran reorganizar, serían factores negativos desde el punto de vista de la producción de antibióticos β -lactámicos. Por tanto, una modificación que debe hacerse en el futuro es cambiar el marcador procariota actual por los genes de resistencia a tetraciclina o a kanamicina, por ejemplo, de modo análogo a como se ha comunicado en una situación similar [359].

3.E. Posibilidades del sistema desarrollado.

El sistema presenta las características de que interviene un gen de resistencia (*Shble*) y un gen (*pyr-4*) cuyas mutaciones deberían poder seleccionarse de forma directa usando ácido fluororótico. Además, el procedimiento puesto a punto muestra una frecuencia relativamente alta. Estas peculiaridades se podrían emplear para clonar promotores al azar, elaborar un sistema de transformación repetida o clonar directamente un gen homólogo por complementación de una estirpe mutante. Tales posibilidades se discuten a continuación.

1) **Clonación de promotores.** El interés en poseer promotores de una especie poco estudiada como *C. acremonium* es obvio, y reside principalmente en poder elaborar vectores de expresión para genes homólogos o heterólogos. Debe pensarse que los transformantes estables obtenidos con pUT713 (es decir, con el gen *Shble* sin promotor) también han integrado copias del plásmido. En algunas de las copias integradas deben existir

fusiones entre secuencias capaces de promover transcripción y el gen *Shble*. Basándose en este hecho se han aislado promotores con vectores integrativos [187, 388], según se apuntó en el apartado 3.C de la Introducción.

2) **Transformación repetida.** Se puede proponer el desarrollo de un sistema de transformación que permitiera un número ilimitado de cambios. Tal hipótesis se basa en que se puedan obtener mutaciones en el gen *pyr-4* por transformación, y que las cepas de *C. acremonium* afectadas en dicho gen se puedan seleccionar o caracterizar con FOA.

Cada ciclo de modificaciones constaría de dos fases. En primer lugar se debería construir un vector con una fusión traduccional *pyr-4'::'Shble* idéntica a la producida en pFUN, pero flanqueada en ambos lados con suficiente cantidad de DNA como para permitir el sobrecruzamiento en los dos extremos con las zonas correspondientes del genoma (Fig. 36). La transformación con el inserto del vector (DNA lineal) permitiría hacer una interrupción del gen *pyr-4*. De este modo, al final de la fase I podrían aislarse transformantes resistentes a fleomicina y auxótrofos para pirimidinas (por tanto, resistentes al FOA), que hubieran integrado una sola copia del fragmento lineal citado (Fig. 36). Un enfoque análogo al planteado ha permitido obtener mutantes con el gen estructural de la OMPdecase inactivado en otras especies, como se ha señalado en el apartado 3.A de esta Discusión.

Una vez obtenido y caracterizado el clon mencionado al final de la fase I, se usaría como receptor de otra transformación, empleando como marcador el DNA lineal que contiene el gen *pyr-4* y seleccionando en medio mínimo (fase II, Fig. 36). Al final de la fase II podrían tenerse transformantes protótrofos (por tanto, sensibles al FOA) y sensibles a fleomicina (por haber sustituido la zona que contiene el gen *Shble* con la zona genómica que contiene el gen *pyr-4*). Es decir, acabada la fase II se tendrían clones idénticos a la estirpe original sin transformar por lo que

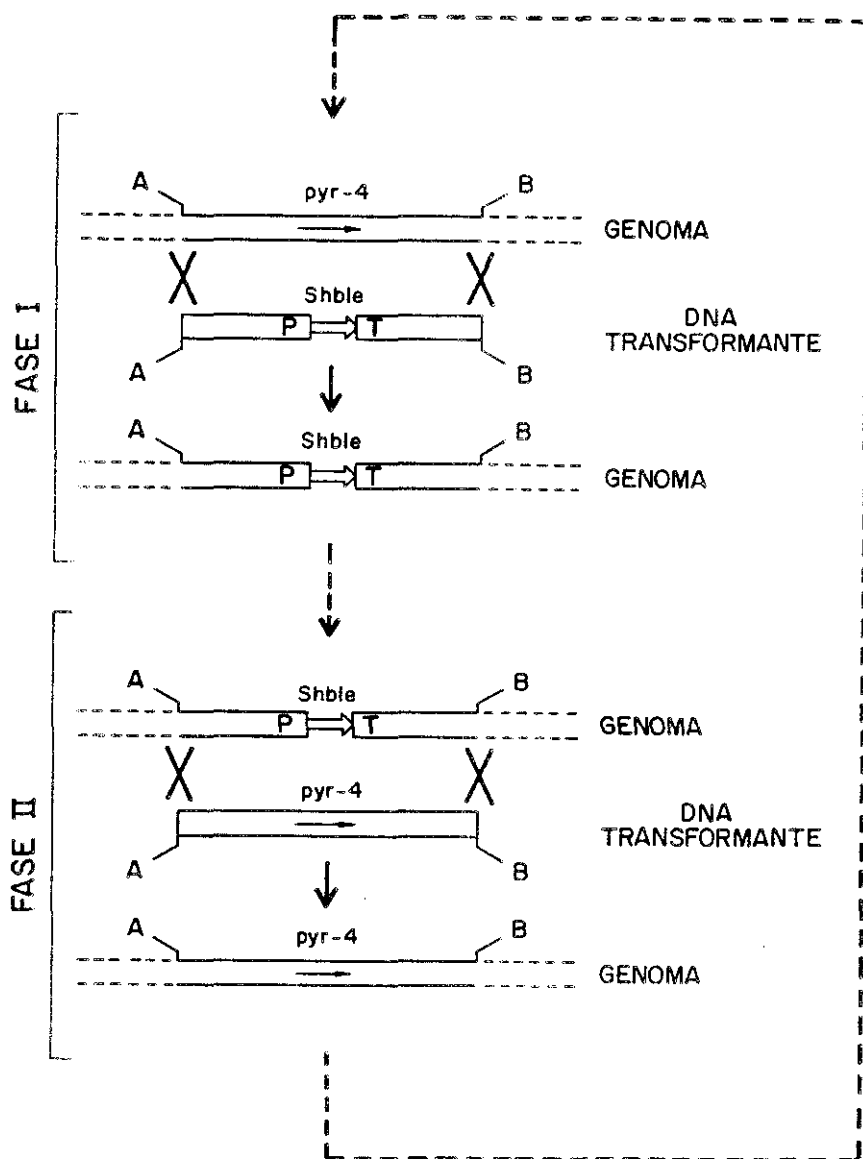


Fig. 36.- Esquema del método propuesto para establecer un sistema de transformación repetida en *C. acremonium*. Las letras A y B indican sitios de restricción iguales o distintos, y únicos en la zona delimitada por los dos sobrecruzamientos, que se señalan con aspas. P y T indican el promotor y el terminador del gen *pyr-4*, respectivamente. Explicación en el texto.

respecta a los marcadores (Fig. 36). Si en alguna de las dos fases se introducen los genes de interés por cotransformación (procedimiento que también se ha demostrado en *C. acremonium* [412]), al final del primer ciclo de modificación se podrían hacer otros ciclos de modificaciones, repitiendo las dos fases señaladas.

Esta posibilidad de transformación repetida, en la que están implicados un gen de resistencia y el gen estructural de la OMPdecase, se ha llevado a cabo parcialmente en *D. discoideum* [200], y podría aplicarse a *C. acremonium* como prolongación del sistema de transformación desarrollado en este trabajo. En *S. cerevisiae* se ha descrito un procedimiento que permite un número ilimitado de transformaciones, basándose en la escisión del marcador *URA3* y la selección con *FOA* [3]. También en *A. niger* se ha comunicado la curación del gen marcador *pyrG*, lo que permite la retransformación de cepas en programas de mejora genética [109, 120].

Las dudas que surgen en el método propuesto son la probabilidad de dirigir la integración de los marcadores en ambas fases y la obtención de transformantes con una copia única del marcador en ambos casos. Es un hecho que la frecuencia de transformación, el número de copias integradas y su lugar de integración varía entre especies, cepas, marcadores, zonas del genoma e incluso según las condiciones de la transformación [322]. De la literatura se deduce que *C. acremonium*, como *N. crassa*, tiene mayor tendencia a integraciones múltiples y generalmente ectópicas en comparación con *A. nidulans* o *S. cerevisiae*, en donde es más frecuente obtener integraciones únicas y homólogas. En este trabajo se demuestra que pueden obtenerse transformantes por resistencia a fleomicina con una sola copia del vector pFUN, aunque no es frecuente (1 clon de 12 analizados). En este estudio no se ha detectado recombinación homóloga, pero tal hecho se ha conseguido en *C. acremonium*, bien interrumpiendo un gen [175], o bien sustituyéndolo con una integración de tipo III [412]. La probabilidad de dirigir la

integración al *locus* de interés se aumenta en *N. crassa* -como en *S. cerevisiae* [288; revisado en 330] o en *A. nidulans* [266]- usando fragmentos largos de DNA homólogo linealizado por donde se quiere hacer el intercambio [7, 121, 210, 290]. El aumento de la longitud del DNA homólogo lineal para dirigir la integración también se ha empleado en la transformación de protoplastos de plantas [cfr., p. ej., 32] y de células de animales [126]. Se ha apuntado que la longitud del DNA transformante lineal tenga un valor óptimo y que esta técnica deba su eficacia a la posibilidad de incluir zonas proclives a la recombinación [7, 163, 164]. El uso de DNA lineal, además, aumenta en ocasiones la frecuencia de transformación, incluso en *C. acremonium* [356, 357]. Otros métodos que se han empleado para dirigir la integración y obtener transformantes con una sola copia son el tratamiento controlado con DNA polimerasa de T4 del DNA lineal [249] o el uso de vectores con el DNA en forma de banda simple en lugar de banda doble [147, 354]. Para prevenir integraciones múltiples puede recurrirse a transformar con poca cantidad de DNA [118]. La obtención de transformantes con una integración única en la fase II debería ser menos problemática, pues una sola copia del gen debe ser suficiente para restablecer el crecimiento como en la cepa original.

3) **Clonación directa.** Con el procedimiento puesto a punto (aparte de las consideraciones hechas en el apartado 3.D para aumentar su frecuencia) se podrían clonar genes de *C. acremonium* directamente, complementando mutaciones de las cepas apropiadas.

El vector pFUN posee un corte *Bam*HI único en el pueden ligarse fragmentos del DNA genómico de *C. acremonium* digerido parcialmente con *Sau*3A para construir una genoteca. Según se comentó en el apartado 3.C de la Introducción, el número de clones necesario para tener representado el genoma de *C. acremonium* con una probabilidad del 99 % oscila entre 10.500 (inserto medio: 10 kb) y 21.000 (inserto medio: 5 kb). A partir de 1 g de micelio se obtienen $1,3 \times 10^9$ protoplastos (como media)

y extrapolando a partir de los resultados obtenidos en los experimentos de transformación (10^8 protoplastos + 20 μ g de pFUN = 1.800 transformantes, como media) se llega a la conclusión de que se podrían obtener ~23.000 transformantes/g de micelio, para lo que serían necesarios 260 μ g de pFUN.

Por tanto, el número de transformantes que se obtienen a partir de 1 g de micelio es suficiente como para tener representada siquiera una vez cualquier secuencia del genoma de *C. acremonium*. Deben hacerse otras observaciones: a) El número de transformantes obtenido sería menor del extrapolado a partir de los valores establecidos con pFUN, puesto que, a igualdad de masa de DNA transformante, el número de moléculas de plásmido en una genoteca es menor. b) El número de copias presentes en los transformantes de *C. acremonium* es, como media, de más de 1 copia/transformante. Consecuentemente, el número de transformantes necesario debe ser tantas veces menor como el número medio de copias que se integren en cada transformante. c) También hay que considerar que no todos los plásmidos de la genoteca construida en pFUN tendrían la misma probabilidad de transformar, ya que hay zonas del genoma más proclives a la recombinación.

Por consiguiente, el número teórico calculado en el párrafo anterior es puramente orientativo. Como los plásmidos integrados pueden encontrarse repetidos en tándem, se podrían producir reorganizaciones y deleciones, por lo que la recuperación no siempre resultaría factible [118]. En consecuencia, parece más indicado proponer un sistema de clonación directa basado en la transformación sucesiva con grupos de clones genómicos al azar, organizados por el grado decreciente de complejidad (*sib selection*). En el caso de este trabajo serían necesarias 4 rondas de transformación, usando en cada ronda 10 ó 12 tubos de transformación (en las condiciones establecidas de 10^8 protoplastos y 20 μ g de genoteca construida en pFUN y amplificada), según se tratase de un inserto medio de 10 kb o de 5 kb, respectivamente ($10^4=10.000$; $12^4=21.000$). En la primera

DISCUSION

ronda se transformarían 10-12 alícuotas de 10^8 protoplastos de la estirpe mutante con 20 μg de genoteca cada una, lo que correspondería a 1.000 plásmidos distintos/alícuota. Localizado el grupo en el que se obtiene complementación, se volvería a transformar la cepa mutante de *C. acremonium* con el siguiente grupo de menor complejidad, es decir, 100 plásmidos distintos por cada una de las 10 ó 12 alícuotas. Del mismo modo, en las rondas 3ª y 4ª se transformaría con 10 plásmidos distintos y el plásmido puro por alícuota, respectivamente.

El método propuesto es similar al desarrollado para clonar el gen *nic-1* de *N. crassa* [2], con la diferencia de que, dadas las frecuencias de transformación (≥ 2 órdenes de magnitud superior en el caso de *N. crassa*), se necesitaría mayor cantidad de genoteca amplificada para aplicarlo en *C. acremonium*. Esto obligaría a usar preparaciones de DNA obtenido a mayor escala, no siendo posible transformar con minipreparaciones de la genoteca organizada. El mayor grado de amplificación lleva asociado una pérdida de representatividad que se suma a las propias de una genoteca [248]. La validez de este sistema de clonación queda supeditada principalmente a poseer el mutante de interés, la facilidad de detectar el fenotipo buscado y la evaluación del esfuerzo requerido frente a métodos alternativos (complementación de *E. coli* o levadura, hibridación heteróloga, hibridación con sondas sintéticas, etc.). A este respecto debe señalarse que *C. acremonium* crece más despacio que otras especies fúngicas, sobre todo en medios mínimos como los empleados en este trabajo.

V. CONCLUSIONES

1) Se ha clonado el gen estructural que codifica para la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (E. C. 4.1.1.23) de la cepa silvestre de *Cephalosporium acremonium* (ATCC 11550), y se le ha denominado *pyr-4*.

2) Se ha determinado la secuencia nucleotídica de la región codificante del gen *pyr-4* de *C. acremonium* y de las zonas que flanquean a la misma en ambos extremos. El producto génico deducido tiene 376 aminoácidos y un peso molecular de 41.128 g/mol.

3) Mediante análisis comparado de secuencias, se propone una sonda degenerada para clonar por hibridación el gen equivalente de otros eucariotas.

4) Se ha construido un vector (pFUN) que alberga una fusión traduccional en la que la expresión de un gen bacteriano que confiere resistencia a fleomicina (*Shble*) está modulada por el promotor del gen *pyr-4*. De este modo se ha elaborado un sistema para transformar protoplastos de *C. acremonium* cuya frecuencia alcanza cifras medias cercanas a los 100 transformantes/ μ g de DNA. Tal valor haría posible el aislamiento de genes de esta especie por complementación.

5) Se demuestra que el método desarrollado para la cepa silvestre se puede aplicar a una cepa semi-industrial (ATCC 48272) con pocas modificaciones.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Aharonowitz Y, Cohen G & Martín JP, 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: organization, regulation and evolution. *Annu Rev Microbiol*, 46:461-465.
2. Akins RA & Lambowitz AM, 1985. General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol Cell Biol*, 5:2272-2278.
3. Alani E, Cao L & Kleckner N, 1987. A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*, 116:541-545.
4. Alani E & Kleckner N, 1987. A new type of fusion analysis applicable to many organisms: protein fusions to the *URA3* gene of yeast. *Genetics*, 117:5-12.
5. Anaya N & Roncero MIG, 1991. Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Mol Gen Genet*, 230:449-455.
6. Arst HN & Scazzocchio C, 1985. Formal Genetics and Molecular Biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. En: Bennett JW & Lasure LL (eds.). *Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, Londres. Cap. 13, pp. 309-343.
7. Asch DK & Kinsey JA, 1990. Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa* with the cloned *am* (GDH) gene. *Mol Gen Genet*, 221:37-43.
8. Austin B, Hall RM & Tyler BM, 1990. Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene*, 93:157-162.
9. Austin B & Tyler BM, 1990. Strategies for high-frequency cotransformation of *Neurospora crassa*. *Exp Mycol*, 14:9-17.
10. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (eds.), 1989 y ss. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/John Wiley & Sons, Nueva York.
11. Ayala FJ y Kiger JA, 1984. *Genética moderna*. Omega, Barcelona. Cap. 22: Especiación y macroevolución, pp.730-780.
12. Bach M-L, Lacroute F & Botstein D, 1979. Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:386-390.
13. Bach M-L, 1987. Cloning and expression of the OMP decarboxylase gene *URA4* from *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*, 12:527-534.
14. Bachmann BJ, 1987. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. En: Neidhardt FC (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium -Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU. Vol. II, Cap. 53, pp. 807-876.
15. Baldwin JE, Killin SJ, Pratt AJ, Sutherland JD, Turner NJ, Crabbe MJC, Abraham EP & Willis AC, 1987. Purification and characterization of cloned isopenicillin N synthetase. *J Antibiotics*, 40:652-659.
16. Baldwin JE, Adlington RM, Crouch NP, Coates JB, Keeping JW, Schofield CJ, Shuttleworth WA & Sutherland JD, 1988. Substrate specificity of cloned deacetoxycephalosporin C/Deacetylcephalosporin C synthetase. *J Antibiotics*, 41:1694-1695.
17. Baldwin JE, Coates JB, Moloney MG, Shuttleworth WA & Pratt AJ, 1989. Advances in the molecular understanding of β -lactam biosynthesis. En: Herschberger CL et al. (eds.), op. cit. [168], pp. 270-278.
18. Baldwin JE, Blackburn JM, Schofield CJ & Sutherland JD, 1990. High level expression in *Escherichia coli* of a fungal gene under the control of strong promoters. *FEMS Microbiol Lett*, 68:45-52.
19. Baldwin JE, Blackburn JM, Sutherland JD & Wright MC, 1991. High-level soluble expression of isopenicillin N synthase isozymes in *E. coli*. *Tetrahedron*, 47:5991-6002.
20. Ballance DJ Buxton FP & Turner G, 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Comm*, 112:284-289.
21. Ballance DJ & Turner G, 1985. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36:321-331.
22. Ballance DJ & Turner G, 1986. Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: isolation of the isocitrate lyase gene (*acuD*). *Mol Gen Genet*, 202:271-275.
23. Ballance DJ, 1991. Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. En: Leong SA & Berka RM (eds.), op. cit. [232], Cap. 1, pp. 1-29.
24. Baltz RH, 1985. Strain improvement: Introduction. En: Dainin AL & Solomon NA (eds.), op. cit. [98], p. 154.
25. Barber M & associates, 1991. *Medicinal Chemical Monographs*. Vol. 4. PJB Publications Ltd., Surrey, Reino Unido.
26. Baron M, Reynes J-P, Stassi D & Tiraby G, 1992. A selectable bifunctional β -galactosidase::phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene*, 114:239-243.
27. Baron M, Tiraby G, Calmels T, Parriche M & Durand H, 1992. Efficient secretion of human lysozyme fused to the Shble phleomycin resistance protein by the fungus *Tolypocladium geodes*. *J Biotechnol*, 24:253-266.
28. Barredo JL, Cantoral JM, Alvarez E, Díez B & Martín JP, 1989. Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-28. *Mol Gen Genet*, 216:91-98.
29. Barredo JL, Díez B, Alvarez E & Martín JP, 1989. Large amplification of a 35-kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet*, 16:453-459.
30. Barredo JL, van Solingen P, Díez B, Alvarez E, Cantoral JM, Kattavilder A, Smaal EB, Groenen MAM, Veenstra AE & Martín JP, 1989. Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A:6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, 83:291-300.
31. Barredo JL, 1990. *Análisis de una región del genoma de Penicillium chrysogenum que contiene los genes pcbC y penDE*. Tesis doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León.
32. Saur M, Potrykus I & Paszkowski, 1990. Intermolecular homologous recombination in plants. *Mol Cell Biol*, 10:492-500.
33. Benito EP, Díaz-Minguez JM, Iturriaga EA, Campuzano V & Esilava AP, 1992. Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* *pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*, 116:59-67.
34. Bérdy J, 1980. Bleomycin-type antibiotics. En: Bérdy J (ed.). *Handbook of antibiotic compounds*. Vol. IV. Part I. *Aminoacid and Peptide Antibiotics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 459-491.
35. Bergès T & Barreau C, 1989. Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. *J Gen Microbiol*, 135:601-604.
36. Bergès T, Perrot M & Barreau C, 1990. Nucleotide sequences of the *Trichoderma reesei* *ura3* (OMPcase) and *ura5* (OPRTase) genes. *Nucleic Acid Res*, 18:7183.

BIBLIOGRAFIA

37. Bergès T & Barreau C, 1991. Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. *Curr Genet*, 19:359-365.
38. Beri RK & Turner G, 1987. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene as a dominant selective marker. *Curr Genet*, 11:639-641.
39. Berse B, Dmochowska A, Skrzypek M, Wąglinski P, Bates MA & Weiss RL, 1983. Cloning and characterization of the ornithine carbamoyltransferase gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 25:109-117.
40. Birkett JA & Hamlyn PF, 1985. Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium*. In: Peberdy & Perenczy (eds.), op. cit. [293]. Cap. 10, pp. 207-223.
41. Boeke JF, Lacroute F & Fink GR, 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, 197:345-346.
42. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G & Fink GR, 1987. 5-fluororotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. In: Guthrie C & Fink GR (eds.), op. cit. [154]. Cap. 10, pp. 164-175.
43. Bos CJ, 1987. Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Curr Genet*, 12:471-474.
44. Bos CJ, Debets AJM, Kobus G, Slakhhorst SM & Swart K, 1989. Adenine and pyrimidine genes of *Aspergillus niger* and evidence for a seventh linkage group. *Curr Genet*, 16:397-410.
45. Bos CJ, Debets JM, Nachtegaal H, Slakhhorst SM & Swart K, 1991. Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by filtration enrichment and lytic enzymes. *Curr Genet*, 21:117-120.
46. Botstein D, Falco SC, Stewart SE, Brennan M, Scherer S, Stinchcomb DT, Struhl K & Davis RW, 1979. Sterile host yeast (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, 8:17-24.
47. Botstein D & Fink GR, 1988. Yeast: An experimental organism for Modern Biology. *Science*, 240:1439-1443.
48. Boy-Marcotte E & Jacquet M, 1982. A *Dictyostelium discoideum* DNA fragment complements a *Saccharomyces cerevisiae* *ura3* mutant. *Gene*, 20:433-440.
49. Boy-Marcotte E, Vilaine F, Camonis J & Jacquet M, 1984. A DNA sequence from *Dictyostelium discoideum* complements *ura3* and *ura5* mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 193:406-413.
50. Brody RS & Westheimer FH, 1979. The purification of orotidine-5'-phosphate decarboxylase from yeast by affinity chromatography. *J Biol Chem*, 254:4236-4244.
51. Brotzu G, 1948. Ricerche su di un nuovo antibiotico. Lavori dell'Istituto D'Igiene di Cagliari, 1-11.
52. Bunnell CA, Luke WD & Perry FM, 1986. Industrial manufacture of cephalosporins. In: Queener SF et al., (eds.), op. cit. [314]. Cap. 9, pp. 255-283.
53. Burger G, Staus J, Scazzocchio C & Franz-Lang B, 1991. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol Cell Biol*, 11:5746-5755.
54. Burnham MKR, Hodgson JE & Normansell IA, 1987. Isolation and expression of genes involved in the biosynthesis of beta-lactams. European Patent Application 87300757.9.
55. Buxton FP & Radford A, 1982. Isolation and mapping of fluoropyrimidine-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet*, 185:129-131.
56. Buxton FP & Radford A, 1982. Partial characterization of 5-fluoropyrimidine-resistant mutants of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet*, 185:132-135.
57. Buxton FP & Radford A, 1983. Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 190:403-405.
58. Buxton FP, Gwynne DI & Davies RW, 1985. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 37:207-214.
59. Bycroft BW & Shute RE, 1987. Chemistry and biosynthesis of penicillins and cephalosporins. In: Peberdy JF (ed.), op. cit. [294]. Cap. 5, pp. 113-160.
60. Calmels T, Parriche M, Durand H & Tiraby G, 1991. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet*, 29:309-314.
61. Calmels T, Martin F, Durand H & Tiraby G, 1991. Proteolytic events in the processing of secreted proteins in fungi. *J Biotechnol*, 17:51-66.
62. Cantoral JM, Díez B, Barredo JL, Alvarez E & Martín JF, 1987. High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology*, 5:494-497.
63. Cantoral JM, 1988. Clonación, caracterización y expresión del gen *pyrG* de *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. Estudio comparativo con otros genes homólogos. Tesis doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León.
64. Cantoral JM, Barredo JL, Alvarez E, Díez B & Martín JF, 1988. Nucleotide sequence of the *Penicillium chrysogenum* *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene. *Nucleic Acid Res*, 16:8177.
65. Cantwell CA, Beckmann RJ, Dotzlaef JE, Fisher DL, Skatrud PL, Yeh W-K & Queener SW, 1990. Cloning and expression of a hybrid *Streptomyces clavuligerus* *cefE* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet*, 17:213-221.
66. Cantwell CA, Whiteman P, Queener SW & Abraham EP, 1992. Isolation of deacetoxycephalosporin C from fermentations broths of *Penicillium chrysogenum* transformants: construction of a new fungal biosynthetic pathway. *Proc R Soc Lond B*, 248:283-289.
67. Carr LG, Skatrud PL, Scheetz ME, Queener SW & Ingolia TD, 1986. Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, 48:257-266.
68. Carr LG, Skatrud PL, Ingolia TD & Queener SW, 1987. Organization of the 5.8 S, 16-18 S, and 23-28 S ribosomal RNA genes of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 12:209-214.
69. Casadaban MJ & Cohen SN, 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:4530-4533.
70. Chang ACM, Hall RM & Williams KL, 1991. Bleomycin resistance as a selectable marker of the eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, 107:165-170.
71. Chapman JL, Ingolia TD, Kaster KR, Queener SW & Skatrud PL, 1984. Method for transforming a *Cephalosporium* cell. US Patent 654919.
72. Chapman JL, Ingolia TD, Kaster KR, Queener SW & Skatrud PL, 1985. Method for transforming a *Cephalosporium* cell. European Patent Application 85306765.0.
73. Chapman JL, Skatrud PL, Ingolia TD, Samson SM, Kaster KR & Queener SW, 1987. Recombinant DNA studies in *Cephalosporium acremonium*. *Dev Ind Microbiol*, 27:165-174.
74. Cheevadhanarak S, Saunders G, Ranno DV, Flegel TW & Holt G, 1991. Transformation of *Aspergillus oryzae* with a dominant selectable marker. *J Biotechnol*, 19:117-122.

BIBLIOGRAFIA

75. Chen CW, Lin H-F, Kuo CL, Tsai H-L & Tsai F-Y, 1988. Cloning and expression of a DNA sequence conferring cephamycin C production. *Biotechnology*, 6:1222-1224.
76. Chen J-T, Lin S-Y & Tsai H, 1991. Enzymic and chemical conversions of cephalosporin C to 7-(Glutaryl-amido) cephalosporanic acid. *J Biotechnol*, 19:203-210.
77. Chen M-W, Anné J, Volckaert G, Huysmans E, Vandenberghe A & De Waele R, 1984. The nucleotide sequence of the 5S rRNAs of seven moulds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acid Res*, 12:4881-4892.
78. Cheng C, Tsukagoshi N & Ueda S, 1990. Transformation of *Trichoderma viride* using the *Neurospora crassa* pyr4 gene and its use in the expression of a Taka-amylase A gene from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet*, 18:453-456.
79. Choi HT, Revuelta JL, Sadhu C & Jarayam M, 1988. Structural organization of the *TRP1* gene of *Phycomyces blakesleeanus*: implications for evolutionary gene fusion in fungi. *Gene*, 71:85-95.
80. Clarke L & Carbon J, 1976. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 9:91-99.
81. Coleman JE, 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem*, 61:897-946.
82. Collins OR, 1987. Reproductive biology and speciation in Myxomycetes. En: Bräiser CM, Rayner ADM & Moore D (eds.). *Evolutionary Biology of the Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido), pp. 271-283.
83. Collis CM & Hall RM, 1985. Identification of a Tn5 determinant conferring resistance to phleomycin, bleomycins and tetracyclines. *Plasmid*, 14:143-151.
84. Coque JJR, Liras P, Laiz L & Martín JF, 1991. A gene encoding lysine 6-aminotransferase, which forms the 8-lactam precursor α -aminoadipic acid, is located in the cluster of cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. *J Bacteriol*, 173: 6258-6264.
85. Coque JJR, Martín JF, Calzada JG & Liras P, 1991. The cephamycin biosynthetic genes *pcbAB*, encoding a large multidomain peptide synthetase, and *pcbC* of *Nocardia lactamdurans* are clustered together in an organization different from the same genes in *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol Microbiol*, 5:1125-1133.
86. Coque JJR, Liras P & Martín JF, 1993. Genes for 8-lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. *EMBO J*, 12:631-639.
87. Cosset F-L, Legras C, Chebloune Y, Savatier P, Thoraval P, Thomas J-L, Samarut J, Nigon V-M & Verdier G, 1990. A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genomes. *J Virol*, 64:1070-1078.
88. Cowen DL & Segelzahn AB, 1981. *Antibiotics in Historical Perspective*. Editado por Marck, Sharp & Dohme International.
89. Cullen D, Wilson LJ, Gray GL, Henner DJ, Turner G & Ballance DJ, 1987. Sequence and centromere proximal location of a transformation enhancing fragment *asm1* from *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acid Res*, 15:9163-9175.
90. Cullen D, Gray GL & Berka RM, 1988. Molecular cloning vectors for *Aspergillus* and *Neurospora*. En: Rodríguez RL & Denhardt DT (eds.). *Vectors. A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*. Butterworths, Stoneham (Mass), EE.UU.
91. Davis B, 1985. Factor influencing protoplasts isolation. En: Peberdy JF & Peranczy L (eds.), op. cit. [293]. Cap 5, pp. 45-71.
92. Davis MA & Hynes MJ, 1989. Regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet*, 5:14-19.
93. Day LE & Ellis LF, 1971. Virus-like particles in *Cephalosporium acremonium*. *Appl Microbiol*, 22: 919-920.
94. De Montigny J, Belarbi A, Hubert J-C & Lacroute F, 1989. Structure and expression of the *URA5* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 215:455-462.
95. De Montigny J, Kern L, Hubert J-C & Lacroute, 1990. Cloning and sequencing of *URA10*, a second gene encoding orotate phosphoribosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 17:105-111.
96. De Ruiter-Jacobs YMJT, Broekhuijsen M, Unkles SE, Campbell EI, Kinghorn JR, Contreras R, Pouwels PH & van den Hondel CAMJJ, 1989. A gene transfer system based on the homologous *pyrG* gene and efficient expression of bacterial genes in *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet*, 16:159-163.
97. Demain AL, 1983. Strain exchange between Industry and Academia. *ASM News*, 49:431.
98. Demain AL & Solomon NA (eds.), 1985. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, EE. UU.
99. Demain AL & Wolfe S, 1987. Biosynthesis of cephalosporins. *Dev Ind Microbiol*, 27:175-182.
100. Dhawale SS, Paietta JV & Marxluf GA, 1984. A new rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr Genet*, 8: 77-79.
101. Díaz-Minguez JM, Iturriaga EA, Benito SP, Corrochano LM & Esalva AP, 1990. Isolation and molecular analysis of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*pyrG*) of *Phycomyces blakesleeanus*. *Mol Gen Genet*, 224:269-278.
102. Díez B, Alvarez E, Cantoral JM, Barrado JL & Martín JF, 1987. Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Curr Genet*, 12:277-282.
103. Díez B, Gutiérrez S, Barrado JL, van Solingen P, van der Voort LHM & Martín JF, 1990. The cluster of penicillin biosynthetic genes. *J Biol Chem*, 265:16358-16363.
104. Doherty JB y 18 autores más, 1986. Cephalosporin antibiotics can be modified to inhibit human leucocyte elastase. *Nature*, 322:192-194.
105. Donovan WP & Kushner SR, 1983. Cloning and physical analysis of the *pyrF* (encoding for orotidine-5'-phosphate decarboxylase) from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, 25:39-48.
106. Donovan WP & Kushner SR, 1983. Purification and characterization of orotidine-5'-phosphate decarboxylase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 156:620-624.
107. Drew SW & Wallis DA, 1983. Regulation of secondary metabolism and keys to its manipulation. En: Bennet JW & Ciegler A (eds.). *Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. Cap. 2, pp. 35-54.
108. Drocourt D, Calmels T, Reynes J-P, Baron M & Tiraby G, 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* *b1e* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acid Res*, 18:4009.
109. Dunn-Coleman NS y 15 autores más, 1991. Commercially viable levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotechnology*, 9: 976-981.
110. Dunne PW & Oakley BR, 1988. Mitotic gene conversion, reciprocal recombination and gene replacement at the *benA*, *beta*-tubulin, locus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 213:339-345.
111. Durairaj M, Doran JL & Jensen SE, 1992. High-level expression of the *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 58:4038-4041.
112. Durand H, Baron M, Calmels T & Tiraby G, 1988.

BIBLIOGRAFIA

- Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains. En: Aubert JP, Bequin P & Millet J (eds.). *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Academic Press, Londres, pp. 135-151.
113. Durand M, Raymond P & Favre M, 1991. Transformation of *Penicillium roqueforti* to phleomycin- and to hygromycin B-resistance. *Curr Genet*, 19:149-153.
114. Eisenberg M, Gathy K, Vincent T & Rawls J, 1990. Molecular cloning of the UMP synthase gene rudimentary-like from *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 222:1-8.
115. Espeso E & Peñalva MA, 1992. Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 6:1457-1465.
116. Faure M, Kalakine M, Boy-Marcotte E & Jacquet M, 1988. Developmental control of the expression of the dihydroorotate dehydrogenase and UMP synthase genes in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ*, 22:159-164.
117. Fincham JRS, Day PR & Radford A, 1979. *Fungal Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
118. Fincham JRS, 1989. Transformation in fungi. *Microbiol Rev*, 53:148-170.
119. Floss HG, 1987. Hybrid antibiotics -The contribution of the new gene combinations. *Trends Biotechnol*, 5: 111-115.
120. Fowler T & Barka RM, 1991. Gene expression systems for filamentous fungi. *Curr Opin Biotechnol*, 2:691-697.
121. Frederick GD, Asch D & Kinsey JA, 1989. Use of transformation to make targeted sequence alterations at the *am* (GDH) locus of *Neurospora*. *Mol Gen Genet*, 217:294-300.
122. Friedlin E & Nuesch J, 1982. Isolation of a selective marker from *Cephalosporium acremonium* by complementation of an auxotrophic mutant of *E. coli*. *Curr Genet*, 8:271-276.
123. Frischauf A-M, Lehrach H, Poustka A & Murray N, 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol*, 170:827-842.
124. Froeliger EH, Muñoz-Rivas A, Spécht CA, Ullrich RC & Novotny CP, 1987. The isolation of specific genes from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Curr Genet*, 12:547-554.
125. Froeliger EH, Ullrich RC & Novotny CP, 1989. Sequence analysis of the *URA1* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase of *Schizophyllum commune*. *Gene*, 83:387-393.
126. Frohman MA & Martin GR, 1989. Cut, past and save: New approaches to altering specific genes in mice. *Cell*, 56:145-147.
127. Fukagawa M, Isogai T, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Koshaka M & Imanaka H, 1991. Direct production of 7-aminodencetyl-cephalosporanic acid by *Acremonium chrysogenum* Hml78. *Agric Biol Chem*, 55: 2163-2165.
128. Gaillardin C & Ribet A-M, 1987. *LEU2* directed expression of β -galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet*, 11:369-375.
129. García-Domínguez M, Lirio P & Martín JP, 1991. Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene of *Streptomyces griseus* NRRL 3851 and studies of expression and complementation of the cephamycin pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:44-52.
130. Gatignol A, Baron M & Tiraby G, 1987. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 207:342-348.
131. Gatignol A, Durand H & Tiraby G, 1988. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett*, 230:171-175.
132. Gatignol A, Dassain M & Tiraby G, 1990. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. *Gene*, 91:35-41.
133. Gens D, Johnstone IL & Clutterbuck JA, 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, 98: 61-67.
134. Genilloud O, Garrido MC & Moreno F, 1984. The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene*, 32:225-233.
135. Gerbaud C, Fournier P, Blanc H, Aigle M, Heslot H & Guirineau M, 1979. High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2- μ m yeast plasmid. *Gene*, 5:233-253.
136. Gillum AM, Tsay EYH & Kirsch DR, 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, 198:179-182.
137. Glazebrook JA, Mitchell K & Radford A, 1987. Molecular genetic analysis of the *pyr-4* gene of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet*, 209:399-402.
138. Glumoff V, Käppli O, Fiechter A & Reiser J, 1989. Genetic transformation of the filamentous yeast, *Trichosporon cutaneum*, using dominant selection markers. *Gene*, 84:311-318.
139. Goldman GH, van Montagu M & Herrera-Estrella A, 1991. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr Genet*, 17:169-174.
140. Gómez-Pardo E & Peñalva MA, 1990. The upstream region of the *IPNS* gene determines expression during secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 89:109-115.
141. González R y Ramón D, 1990. La transformación genética de los hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol*, 7:43-49.
142. Gomori G, 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. En: Colowick SP & Kaplan NO, (eds.). *Preparation and Assay of Enzymes*. (Methods in Enzymology, Vol. I). Academic Press, Nueva York. Cap. 16, pp. 138-146.
143. Goodey AR, Doel SM, Piggott JR, Watson MEE, Zealey GR, Cafferkley R & Carter BLA, 1986. The selection of promoters for the expression of heterologous genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 204:505-511.
144. Goosen T, Bloemheuvel G, Gysler C, De Bie DA, van der Broek HWJ & Swart K, 1987. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene. *Curr Genet*, 11:499-503.
145. Goosen T, van Engelenburgh F, Debets F, Swart K, Bos K & van der Broek H, 1989. Tryptophan auxotrophic mutants in *Aspergillus niger*: inactivation of the *trpC* gene by cotransformation mutagenesis. *Mol Gen Genet*, 219:282-288.
146. Gotoh O, 1982. An improved algorithm for matching biological sequences. *J Mol Biol*, 162:705-708.
147. Goyon C & Faugeron G, 1989. Targeted transformation of *Ascombolus imaricus* and de novo methylation of the resulting duplicated DNA sequences. *Mol Cell Biol*, 9:2818-2827.
148. Grigg GW, Hall RM, Hart NK, Kavulak DR, Lamberton JA & Lane A, 1985. Amplification of the antibiotic effect of the bleomycins, phleomycins and tallysomycins: its dependence on the nature of the variable basic groups. *J Antibiot*, 37:99-110.
149. Grimm C & Kohli J, 1988. Observations on integrative transformation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, 215:87-93.
150. Grimm C, Kohli J, Murray J & Maundrell K, 1988. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as

BIBLIOGRAFIA

a selectable marker. *Mol Gen Genet*, 215:81-86.

151. Gruber F, Visser J, Kubicek CP & De Graaff, 1990. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Curr Genet*, 18:71-76.

152. Gruber F, Visser J, Kubicek CP & De Graaff, 1990. Cloning of the *Trichoderma reesei* *pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr Genet*, 18:447-451.

153. Gurr SJ, Unkles SE & Kinghorn JR, 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En: Kinghorn JR (ed.). *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, Vol. 22. IRL Press, Oxford (Reino Unido). Cap. 5, pp. 93-139.

154. Guthrie C & Fink GR (eds.), 1991. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Methods in Enzymology, Vol. 194)*. Academic Press, San Diego, California.

155. Gutiérrez S, Díez B, Alvarez E, Barredo & Martín JP, 1991. Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol Gen Genet*, 225:56-64.

156. Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E & Martín JP, 1991. Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol*, 173:2354-2365.

157. Gutiérrez S, Velasco J, Fernández PJ & Martín JP, 1992. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol*, 174:3056-3064.

158. Hagerman PJ, 1990. Sequence-directed curvature of DNA. *Ann Rev Biochem*, 59:755-781.

159. Hamer JE & Timberlake WE, 1987. Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter. *Mol Cell Biol*, 7:2352-2359.

160. Hamlyn PF, Bradshaw RE, Mellon F, Santiago CM, Wilson JM & Peberdy JP, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 3:321-325.

161. Hannahan D, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557-580.

162. Harrington RE, 1992. DNA curving and bending in protein-DNA recognition. *Mol Microbiol*, 6:2544-2555.

163. Hasty P, Rivera-Pérez J & Bradley A, 1991. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 11:5586-5591.

164. Hasty P, Rivera-Pérez J & Bradley A, 1992. The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 12:2464-2474.

165. Henikoff S & Cohen EH, 1984. Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 4:1515-1520.

166. Herranz R, 1986. Desarrollo y avances recientes en el campo de los antibióticos β -lactámicos. 1ª parte: *Farmacía Clínica*, 3:464-485. 2ª parte: *ibid.*, 548-562.

167. Herreros E, García-Sáez MI, Nombela C & Sánchez M, 1992. A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol Microbiol*, 6:3567-3574.

168. Hersheberger CL, Queener SW & Hageman G (eds.), 1989. *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, DC, EE. UU.

169. Higgins DG & Sharp PM, 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73:237-244.

170. Hille J, Verheggen F, Roelvink P, Franssen H, van Kammen A & Zabel P, 1986. Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol Biol*, 7:171-176.

171. Hinnen A, Hicks JB & Fink GR, 1978. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:1929-1933.

172. Hoopwood DA, 1970. The isolation of mutants. En: Norris TR & Ribbons DW (eds.). *Methods in Microbiology*, Vol. 3A. Cap. VI, pp. 363-434. Academic Press, Londres.

173. Hoopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J, Fujii I, Rudb BAM, Floss HG & Omura S, 1985. Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering. *Nature*, 314:642-644.

174. Hori H & Osawa S, 1987. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol*, 4:445-472.

175. Hoskins JA, O'Callaghan N, Queener SW, Cantwell CA, Wood JS, Chen VJ & Skatrud PL, 1990. Gene disruption of the *pcbAB* gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 18:523-530.

176. Hynes MJ, Corrick CM, Kelly JM & Littlejohn TG, 1988. Identification of the sites of action for regulatory genes controlling the *amdS* of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*, 8:2589-2596.

177. Hynes MJ & Andrianopoulos A, 1989. Transformation studies of gene regulation in filamentous fungi. En: Hersheberger CL et al. (eds.), *op. cit.* [168], pp. 304-309.

178. Hueson RN, James BE & Young RA, 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in *Mycobacteria*. *J Bacteriol*, 172:519-524.

179. Ingolia TD, Samson SM & Skatrud PL, 1986. Recombinant DNA expression vectors and DNA compounds. European Patent Application 86302873.4.

180. Ingolia TD & Queener SW, 1989. Beta-lactam biosynthetic genes. *Medic Res Rev*, 9:245-264.

181. Ishiya M & Niwa M, 1992. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the cephalosporin acylase gene of a *Pseudomonas* strain. *Biochem Biophys Acta*, 1132:233-239.

182. Isogai T, Yoshida M, Tanaka M & Aoki H, 1987. Transformation of *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* using an antibiotic resistance marker. *Agric Biol Chem*, 51:2321-2329.

183. Isogai T, Ono H, Ishitani Y, Kojo H, Ueda Y & Kohsaka M, 1990. Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. *J Biochem*, 108:1063-1069.

184. Isogai T, Fukagawa M, Kojo H, Kohsaka M, Aoki H & Imanaka H, 1991. Cloning and nucleotide sequence of the complementary and genomic DNAs for the alkaline protease from *Acremonium chrysogenum*. *Agric Biol Chem*, 55:471-477.

185. Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Ueda Y, Kohsaka M & Imanaka H, 1991. Construction of a 7-aminoccephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology*, 9:188-191.

186. Jacquet M, Guillebaud R & Garreau H, 1988. Sequence analysis of the *DDPYR5-6* gene coding for UMP synthase in *Dictyostelium discoideum* and comparison with orotate phosphoribosyl transferases and OMP decarboxylases. *Mol Gen Genet*, 211:441-445.

187. Jain S, Durand H & Tiraby G, 1992. Development of a transformation system for the thermophilic fungus *Talaromyces* sp. CL 240 based on the use of phleomycin

BIBLIOGRAFIA

- resistance as a dominant selectable marker. *Mol Gen Genet*, 234:489-493.
188. J  rai G & Financsek I, 1987. Nucleotide sequence of the 5.8 S ribosomal RNA coding region of *Cephalosporium acremonium*. *Nucleic Acid Res*, 15:9599.
189. J  rai G, Financsek I & J  rai M, 1987. Characterization of the *Cephalosporium acremonium* ribosomal RNA genes. *Gene*, 55:135-139.
190. Jefferies D, Tebbi P, Le Ray D & Pays E, 1993. The ble resistance gene as a new selectable marker for *Trypanosoma brucei*: fly transmission of stable procyclic transformants to produce antibiotic resistant bloodstream forms. *Nucleic Acid Res*, 21:191-195.
191. Jensen KF, Larsen JN, Schack L & Sivertsen A, 1984. Studies on the structure and expression of *Escherichia coli* *pyrC*, *pyrD* and *pyrF* using the cloned genes. *Eur J Biochem*, 140:343-352.
192. Jensen SE, 1985. Biosynthesis of cephalosporins. *CRC Crit Rev Biotechnol*, 3:277-301.
193. Jensen S, Westlake DWS & Wolfe S, 1985. Production of penicillins and cephalosporins in an immobilized enzyme reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 20:155-160.
194. Jensen SE, Leski BK, Doran JL, Petrich AK & Westlake DWS, 1989. Expression of the *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase gene in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*. In: Herenberger CL et al. (eds.), *op. cit.* [168], pp. 239-245.
195. Johnstone IL, 1985. Transformation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Sci*, 2:307-311.
196. Johnstone IL, Hughes SG & Clutterbuck AJ, 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J*, 4:1307-1311.
197. Jones ME, 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann Rev Biochem*, 49:253-279.
198. Jund R & Lacroute P, 1970. Genetic and physiological aspects of resistance to 5-fluoropyrimidines in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 102:607-615.
199. K  fer E & Luk D, 1989. Sensitivity to bleomycin and hydrogen peroxide of DNA repair-defective mutants in *Neurospora crassa*. *Mutation Res*, 217:75-81.
200. Kalpaxia D, Z  ndorf I, Werner H, Raindl N, Boy-Marcotte E, Jacquet M & Dingermann T, 1991. Positive selection for *Dictyostelium discoideum* mutants lacking UMP synthase activity based on resistance to 5-fluororotic acid. *Mol Gen Genet*, 225:492-500.
201. Kammerer B, Guyonbach A & Hubert JC, 1984. Yeast regulatory gene *PPR1*. I. Nucleotide sequence, restriction map and codon usage. *J Mol Biol*, 180:239-250.
202. Kanakas JJ & Suttle DP, 1984. Amplification of the UMP synthase gene and enzyme overproduction in pyrazofurin-resistant rat hepatoma cells. *J Biol Chem*, 259:1848-1853.
203. Kang JH, Hwang Y & Yoo QJ, 1991. Expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol*, 17:99-108.
204. Keller NP, Bergstrom GC & Yoder OC, 1991. Mitotic stability of transforming DNA is determined by its chromosomal configuration in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr Genet*, 19:227-233.
205. Kelly R, Miller SM, Kurtz MB & Kirsch DR, 1987. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol Cell Biol*, 7:199-207.
206. Kelly R, Miller SM & Kurtz MB, 1988. One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet*, 214:24-31.
207. Kern L, De Montigny J, Jund R & Lacroute P, 1990. The *FUR1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, structure and expression of wild-type and mutant alleles. *Gene*, 88:149-157.
208. Kern L, De Montigny J, Lacroute P & Jund R, 1991. Regulation of the pyrimidine salvage pathway by the *FUR1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 19:333-337.
209. Kessenbaum DJ, Salvo VA & Nunes E, 1992. Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J Bacteriol*, 174:3125-3132.
210. Kim SY & Marxluf GA, 1988. Transformation of *Neurospora crassa* with the *trp-1* gene and the effect of host strain upon the fate of the transforming DNA. *Curr Genet*, 13:65-70.
211. Kinsey HH & Kaiser DK, 1991. Targeted disruption of the *Myxococcus xanthus* orotidine 5'-monophosphate decarboxylase gene: effects on growth and fruiting-body development. *J Bacteriol*, 173:6790-6797.
212. Kinsey HH & Kaiser DK, 1992. The orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene of *Myxococcus xanthus*. Comparison to the OMP decarboxylase gene family. *J Biol Chem*, 267:819-824.
213. Kistler HC & Benny UK, 1992. Autonomous replicating plasmids and chromosome rearrangement during transformation of *Nectria haematococca*. *Gene*, 117:81-89.
214. Kitamoto K, Oda K, Gomi K & Takahashi K, 1990. Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from *Sake* yeasts by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric Biol Chem*, 54:2979-2987.
215. Klein RD & Roof LL, 1988. Cloning of the orotidine 5'-phosphate decarboxylase (ODC) gene of *Schwannomyces occidentalis* by complementation of the *ura3* mutation in *S. cerevisiae*. *Curr Genet*, 13:29-35.
216. Kohler RB, Wheat J & White A, 1986. Clinical use of cephalosporins. In: Quesener SF et al. (eds.), *op. cit.* [314], pp. 351-370.
217. Kolar M, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ & Schwab H, 1988. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene*, 62:127-134.
218. Kondo S, Yamagishi A & Oshima T, 1991. Positive selection for uracil auxotrophs of the sulfur-dependent thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* by use of 5-fluoroorotic acid. *J Bacteriol*, 173:7698-7700.
219. Kovacevik S, Weigel B, Tobin MB, Ingolia TD & Miller JR, 1989. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxy-cephalosporin C synthetase. *J Bacteriol*, 171:754-760.
220. Kovacevik S, Tobin MB & Miller JR, 1990. The  -lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxy-cephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol*, 172:3952-3958.
221. Kovacevik S & Miller JR, 1991. Cloning and sequencing of the  -lactam hydroxylase gene (*cahF*) from *Streptomyces clavuligerus*: Gene duplication may have led to separate hydroxylase and expandase activities in the actinomycetes. *J Bacteriol*, 173:398-400.
222. Krianclunas A, Frolik CA, Hassell TC, Skatrud PL, Johnson MG, Holbrook NL & Chen VJ, 1991. The functional role of cysteines in isopenicillin N synthase. *J Biol Chem*, 266:11779-11788.
223. Kronstad JW, Wang J, Covert SF, Holden DW, McKnight GL & Leong SA, 1989. Isolation of metabolic genes and

BIBLIOGRAFIA

- demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene*, 79:97-106.
224. Kross J, Hanner WD, Hecht SM & Haseltine WA, 1982. Specificity of deoxyribonucleic acid cleavage by bleomycin, phleomycin, and tallysomycin. *Biochemistry*, 21:4310-4318.
225. Rück U, Waltz M, Mohr G & Mracek M, 1989. The 5'-sequence of the isopenicillin N-synthetase gene (*pcbC*) from *Cephalosporium acremonium* directs the expression of the prokaryotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 31:358-365.
226. Kudla B, Parsuy MA, Gaillardin C & Heslot H, 1988. Construction of an expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acid Res*, 16:8603-8617.
227. Lacroute F, 1968. Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 95:824-832.
228. Landan G, Cohen G, Aharanowitz Y, Shuali Y, Graur D & Shiffman D, 1990. Evolution of isopenicillin N synthetase genes may have involved horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 7:399-406.
229. Landman O, Shiffan D, Av-Gay Y, Aharanowitz Y & Cohen G, 1991. High level expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthase genes from *Flavobacterium* and *Streptomyces*, and recovery of active enzymes from inclusion bodies. *FEMS Microbiol Lett*, 84:239-244.
230. Lehninger A, 1987. *Biocímica* (2ª ed.). Omega, Barcelona.
231. Lein J, 1986. The Panlabs penicillin strain improvement program. En: Vanek Z & Hostálek Z (eds.). *Overproduction of Microbial Metabolites. Strain Improvement and Process Control Strategies*. Biotechnology series, vol.7. Butterworth, Stoneham (Mass.), EE. UU. Cap. 6, pp. 105-139.
232. Leong SA & Berka RM (eds.), 1991. *Molecular Industrial Mycology - Systems and Applications for Filamentous Fungi*. Marcel Dekker, Nueva York.
233. Lerner CG, Stephenson BT & Switzer RL, 1987. Structure of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster. *J Bacteriol*, 169:2202-2206.
234. Leski BK, Aharanowitz Y, Navarech M, Wolfe S, Vining LC, Westlake DMS & Jenner SE, 1988. Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces calvuligerus*. *Gene*, 62:187-196.
235. Li C, Peck HD & Przybyla AE, 1986. Complementation of an *Escherichia coli pyrF* mutant with DNA from *Desulfovibrio vulgaris*. *J Bacteriol*, 165:641-646.
236. Lieberman I, Kornberg A & Simms ES, 1955. Enzymatic synthesis of pyrimidine nucleotides orotidine-5'-phosphate and uridine-5'-phosphate. *J Biol Chem*, 215:403-415.
237. Liggett RW & Koffler H, 1948. Corn steep liquor in Microbiology. *Bacteriol Revs*, 12:297-311.
238. Lloyd AT & Sharp FM, 1991. Codon usage in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 230:288-294.
239. Loison G, Losson R & Lacroute F, 1980. Constitutive mutants for orotidine 5' phosphate decarboxylase and dihydroorotic acid dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 2:39-44.
240. Losberger C & Ernst JP, 1989. Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr Genet*, 16:153-157.
241. Losson R, Fuchs RPP & Lacroute F, 1985. Yeast promoters *URA1* and *URA3*. Examples of positive control. *J Mol Biol*, 185:65-81.
242. Lowe DA, Romancik G, Cappeletti LM & Elander RP, 1985. Production of cephalosporin C. US Patent 4520101.
243. Lowe DA, 1986. Manufacture of penicillins. En: Queener SF et al., (eds.), op. cit. [314]. Cap. 6, pp. 117-161.
244. Luengo JM & Peñaalva MA, 1993. Penicillin biosynthesis. En: Kinghorn J & Martinelli S (eds.). *Genetics and Physiology of A. nidulans*. Chapman & Hall, Londres. En prensa.
245. MacCabe AM, Riach MBR, Unkles SE & Kinghorn JR, 1990. The *Aspergillus nidulans npeA* locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. *EMBO J*, 9:279-287.
246. MacCabe AP, van Liempt H, Palissa H, Unkles SE, Riach MBR, Pfeifer E, von Döhren H & Kinghorn JR, 1991. 4-(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 266:12646-12654.
247. Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roessel F, Scarsocchio C & Brygoo Y, 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*, 78:147-156.
248. Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J, 1982. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
249. Manstein DJ, Titus MA, De Lozanne A & Spudich JA, 1989. Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J*, 8:923-932.
250. Mariscal Sistiaga F, García Caballero J y Galván Guijo B, 1986. *Cefalosporinas, cefamicinas y oxacefeminas*. Editado por Glaxo, SA, Madrid.
251. Márquez G, Fernández-Sousa JM & Sánchez P, 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of genes involved in the lysine pathway of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol*, 164:379-383.
252. Martín JP & Liras P, 1985. Biosynthesis of 8-lactam antibiotics: design and construction of overproducing strains. *Trends Biotechnol*, 3:39-44.
253. Martín JP & Liras P, 1989. Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 39:153-187.
254. Martín JP, Ingolia TD & Queener SW, 1991. Molecular genetics of penicillin and cephalosporin antibiotic biosynthesis. En: Leong SA & Berka RM (eds.), op. cit. [232], pp. 149-195.
255. Mathison L, Soliday C, Stepan T, Aldrich T & Rambosek J, 1993. Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr Genet*, 23:33-41.
256. Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K, Ichikawa S & Komatsu K-I, 1987. Cloning and characterization of the genes for two cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*, 169:5815-5820.
257. Matsuda A, Toma K & Komatsu K-I, 1987. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*, 169:5821-5826.
258. Mattern IE, Unkles S, Kinghorn JR, Pouwels PH & van den Hondel CAMJJ, 1987. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol Gen Genet*, 210:460-461.
259. Mattern IE & Punt PJ, 1988. A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. *Fungal Newsletter*, 35:25.
260. Mazodier P, Comart P, Giraud E & Gasser P, 1985. Completion of the nucleotide sequence of the central region of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acid Res*, 13:195-205.
261. McClard RW & Shokat KM, 1987. Does the bifunctional uridylyl transferase channel orotidine 5'-phosphate? Kinetics of orotate phosphoribosyltransferase and orodylate

BIBLIOGRAFIA

- decarboxylase activities fit a noninteracting sites model. *Biochemistry*, 26:3378-3384.
262. McLauchlan J, Gaffney D, Whitton JL & Clements JB, 1985. The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. *Nucleic Acid Res*, 13:1347-1368.
263. Medeiros AA & Jacoby GA, 1986. Beta-lactamase-mediated resistance. En: Queener SF et al. (eds.), *op. cit.* [314]. Cap. 3, pp. 49-84.
264. Messing J, Crea R & Seaburg PH, 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acid Res*, 9:309-321.
265. Messing J, 1983. New M13 vectors for cloning. En: Wu R, Grossmann L & Moldave K (eds.), *Recombinant DNA. Part C. (Methods in Enzymology, Vol. 101)*. Academic Press, Nueva York, Cap.2, pp. 20-78.
266. Miller BL, Miller KY & Timberlake WE, 1985. Direct and indirect gene replacements in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*, 5:1714-1721.
267. Miller JH, 1972 (ed.). *Experiments in Molecular Genetics*. CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
268. Miller TL & Churchill BW, 1985. Substrates for large-scale fermentations. En: Demain AL & Solomon NA (eds.), *op. cit.* [98]. Cap. 10, pp. 122-136.
269. Minuth W, Tudzynski P & Esser K, 1982. Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*: I. Characterization and mapping of mitochondrial DNA. *Curr Genet*, 5:227-231.
270. Mizukami M & Hisanuma F, 1988. Isolation and nucleotide sequence analysis of the *URA3* (orotidine 5'-phosphate decarboxylase) gene of *Kluyveromyces fragilis*. *Agric Biol Chem*, 52: 3067-3071.
271. Moss MO, 1987. Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. En: Peberdy JF (ed.), *op. cit.* [294]. Cap. 2, pp. 37-71.
272. Montenegro E, Barrédo JL, Gutiérrez S, Díez B, Alvarez E & Martín JF, 1990. Cloning, characterization of the acyl-CoA:6-amino penicillanic acid acyltransferase gene of *Aspergillus nidulans* and linkage to the isopenicillin N synthase gene. *Mol Gen Genet*, 221:322-330.
273. Mullaney EJ, Hauer JR, Roberti KA, Yelton MM & Timberlake WE, 1985. Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 199:37-45.
274. Mulsant P, Gatignol A, Dalens M & Tiraby G, 1988. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. *Somat Cell Molec Genet*, 14:243-252.
275. Nash CH & Huber FW, 1971. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl Microbiol*, 22:6-10.
276. Nash CH, Mehta RJ & Ball C, 1985. *Cephalosporium acremonium*: A beta-lactam antibiotic-producing microbe. En: Demain AL & Solomon NA (eds.), *Biology of Industrial Microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., California, EE.UU. Cap. 14, pp. 433-448.
277. Neftel KA & Hübner U, 1987. Effects of β -lactam antibiotics on proliferating eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 31:1657-1661.
278. Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
279. Newbury SF, Glazebrook JA & Radford A, 1986. Sequence analysis of the *pyr-4* (orotidine 5'-P decarboxylase) gene of *Neurospora crassa*. *Gene*, 43:51-58.
280. Nombela C y Santamaría C, 1985. Clonación de genes en levadura. En: Barberá-Guillén E (ed.). *Revisión sobre biología celular*. Servicio editorial, Universidad del País Vasco, pp. 3-25.
281. Normak S & Linberg P, 1985. Evolution of resistance to penicillin and cephalosporin antibiotics. *BioEssays*, 3:22-26.
282. Ntsech J, Heim J & Treichler H-J, 1987. The biosynthesis of sulfur-containing β -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol*, 41:51-75.
283. Oakley BR, Rinehart JR, Mitchell BL, Oakley CE, Carmona C, Gray GL & May GS, 1987. Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 61:385-399.
284. Oesser B, Tudzynski P & Esser K, 1986. Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. III. Characterization of a mitochondrial ars. *Appl Microbiol Biotechnol*, 23:280-287.
285. Ohmsted C-A, Langdon SD, Chae C-B & Jones ME, 1986. Expression and sequence analysis of a cDNA encoding the orotidine-5'-monophosphate decarboxylase domain from Ehrlich ascites uridylylase synthase. *J Biol Chem*, 261:4276-4282.
286. Onions AMS & Brady BL, 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. En: Peberdy JF (ed.), *op. cit.*, Cap. 1, pp. 1-36.
287. Orbach MJ, Porro EB & Yanofsky C, 1986. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol Cell Biol*, 6:2452-2463.
288. Orr-Weaver TL, Skozak JW & Rothstein RJ, 1981. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:6354-6358.
289. Oxier-Kalogeropoulos O, Pasiolo F, Adeline M-T, Collin J & Lacroute P, 1991. Cloning, sequencing and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae URA7* gene encoding CTP synthetase. *Mol Gen Genet*, 231:7-16.
290. Paletta JV & Marzluf GA, 1985. Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, 5:1554-1559.
291. Patiño C, 1985. Aislamiento de secuencias de DNA de *Cephalosporium acremonium* relacionadas con el gen de la actina de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid.
292. Patiño C, Sánchez F & Peñalva MA, 1989. Low level expression in *Escherichia coli* of a fungal gene under the control of strong promoters. *FEMS Microb Lett*, 58:139-144.
293. Peberdy JF & Ferenczy L (eds.), 1985. *Fungal protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics*. Marcel Dekker, Nueva York.
294. Peberdy JF (ed.), 1987. *Penicillium and Acremonium*. *Biotechnology Handbooks*, Vol. 1. Plenum Press, Nueva York.
295. Peberdy JF, 1987. Genetics of *Acremonium*. En: Peberdy JF (ed.), *op. cit.* [294]. Cap. 4, pp. 93-111.
296. Peberdy JF, 1989. Fungi without coats -Protoplasts as tools for mycological research. *Mycol Res*, 93:1-20.
297. Penttillä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E & Knowles J, 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61:155-164.
298. Peñalva MA, Tourinho A, Patiño C, Sánchez F, Rubio V & Fernández-Sousa JM, 1984. *Cephalosporium acremonium*. British Patent Application 8428094.
299. Peñalva MA, Tourinho A, Patiño C, Sánchez F, Rubio V & Fernández-Sousa JM, 1985. *Cephalosporium acremonium*. European Patent Application 85308099.2.
300. Peñalva MA, Tourinho A, Patiño C, Sánchez F, Fernández-Sousa JM & Rubio V, 1985. Studies on transformation of *Cephalosporium acremonium*. En: Timberlake WE (ed.), *op.*

BIBLIOGRAFIA

cit. [381], pp. 59-68.

301. Peñalva MA & García JL, 1986. The subunit I of the respiratory-chain NADH dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*: the evolution of a mitochondrial gene. *Curr Genet*, 10:797-801.

302. Peñalva MA, Patiño C & Rubio V, 1986. Structure of a *Cephalosporium acremonium* mtDNA replicator. *FEBS Lett*, 198:92-98.

303. Peñalva MA & Sánchez F, 1987. The complete nucleotide sequence of the *trpC* gene from *Penicillium chrysogenum*. *Nucleic Acid Res*, 15:1874.

304. Peñalva MA, Vian A, Patiño C, Pérez-Aranda A & Ramón D, 1989. Molecular biology of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. En: Herahberger CL et al., (eds.), op. cit. [168], pp. 256-261.

305. Peñalva MA, Moya A, Dopazo J & Ramón D, 1990. Sequences of the isopenicillin N synthetase suggest horizontal gene transfer from procaryotes to eukaryotes. *Proc R Soc Lond B*, 241:164-169.

306. Peñalva MA, Pérez-Esteban B, Gómez-Pardo E, Orejas M & Espeso E, 1992. Penicillin production by *Aspergillus nidulans*: Studies on the regulation of expression of the *IPNS* gene. En: Stahl U & Tudzynski P (eds.). *Molecular Biology of Filamentous Fungi*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Alemania. Cap. 16, pp. 217-227.

307. Peñalva MA, Espeso E, Orejas M & Gómez-Pardo E, 1993. Evolution and control of gene expression of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene. En: Kleinkauf H & von Döhren H (eds.). *Fifty Years of Penicillin Application*. Videopress, Praga. En prensa.

308. Pérez P, Tiraby G, Kallerhoff J & Perret J, 1989. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol Biol*, 13:365-373.

309. Pirt SJ, 1966. A theory of the mode on growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *Proc R Soc Lond B*, 166:369-373.

310. Pirt SJ, 1987. Microbial physiology in the penicillin fermentation. *Trends Biotechnol*, 5:69-72.

311. Platt T, 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann Rev Biochem*, 55:339-372.

312. Proudfoot N, 1991. Poly(A) signals. *Cell*, 64:671-674.

313. Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RDM, Pouwels PH & van den Hondel CAMJJ, 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93:101-109.

314. Queener SF, Webber JA & Queener SW (eds.), 1986. *Beta-Lactam Antibiotics for Clinical Use*. Clinical Pharmacology, Vol. 4. Marcel Dekker Inc, Nueva York.

315. Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, Chapman JL & Kester KR, 1985. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. En: Lieve L (ed.). *Microbiology-1985*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 468-472.

316. Queener SW & Lively DH, 1985. Screening and selection for strain improvement. En: Demain AL & Solomon NA (eds.), op. cit. [98], Cap. 12, pp. 155-169.

317. Queener SW, 1990. Molecular biology of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, 34:943-948.

318. Quinn CL, Stephenson BT & Switzer RL, 1991. Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon. *J Biol Chem*, 266:9113-9127.

319. Radford A, Pope S, Sazci A, Fraser MJ & Parish JH, 1981. Liposome mediated genetic transformation of

Neurospora crassa. *Mol Gen Genet*, 184:567-569.

320. Radford A, Buxton PP, Newbury SF & Glazebrook JA, 1985. Regulation of pyrimidine metabolism in *Neurospora*. En: Timberlake WE (ed.), op. cit. [381], pp.127-143.

321. Radford A & Dix NIM, 1988. Comparison of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase sequences of eight species. *Genome*, 39:501-505.

322. Rambousek J & Leach J, 1987. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *CRC Crit Rev Biotechnol*, 6:357-393.

323. Ramón D, Ferrer S, Vicente E & Uruburu F, 1986. Aurintricarboxylic acid as a nuclease inhibitor in fungal protoplasts. *FEMS Microbiol Lett*, 36:9-13.

324. Ramón D, Carramolino L, Patiño C, Sánchez F & Peñalva MA, 1987. Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the 8-lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 57:171-181.

325. Randall TA & Reddy CA, 1992. The nature of extra-chromosomal maintenance of transforming plasmids in the filamentous basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr Genet*, 21:255-260.

326. Rathod PK, Khatri A, Hubbard T & Milhous WK, 1989. Selective activity of 5-fluoroorotic acid against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 33:1090-1094.

327. Renno DV, Saunders G, Bull AT & Holt G, 1990. The genetic stability of *Penicillium chrysogenum* transformants in a fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 34:364-367.

328. Renno DV, Saunders G, Smith P, Bull AT & Holt G, 1992. Mitotic instability of integrated plasmids in *Penicillium chrysogenum* transformants. *J Biotechnol*, 24:291-298.

329. Rose M, Grisafi P & Botstein D, 1984. Structure and function of the *URA3* gene: expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 29:113-124.

330. Rothstein R, 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. En: Guthrie C & Pink GR (eds.), op. cit. [154]. Cap. 19, pp. 281-301.

331. Rowlands RT, 1984. Industrial strain improvement: Mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb Technol*, 6:3-10.

332. Rowlands RT, 1984. Industrial strain improvement: Rational Screens and genetic recombination techniques. *Enzyme Microb Technol*, 6:290-300.

333. Roy A, Exinger F & Lowson R, 1990. *Cis*- and *trans*-acting regulatory elements of the yeast *URA3* promoter. *Mol Cell Biol*, 10: 5257-5270.

334. Sakai Y, Kazarimoto T & Tani Y, 1991. Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii*: cloning of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (*URA3*), isolation of uracil auxotrophic mutants, and use of the mutants for integrative transformation. *J Bacteriol*, 173:7458-7463.

335. Saloheimo M & Niku-Paavola M-J, 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*, 9:987-990.

336. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* (2^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

337. Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, van Frank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW & Ingolia TD, 1985. Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase from *Cephalosporium acremonium*. *Nature*, 318:191-194.

BIBLIOGRAFIA

338. Samson SM, Chapman JL, Belagaje R, Queener SW & Ingolia TD, 1987. Analysis of the role of cysteine residues in the isopenicillin N synthetase activity by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5705-5709.
339. Samson SM, Dotzlar JE, Slisz ML, Becker GW, van Frank RM, Veal LE, Yeh W-K, Miller JR, Queener SW & Ingolia TD, 1987. Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Biotechnology*, 5:1207-1214.
340. Sancar A, Hack AM & Rupp WD, 1979. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J Bacteriol*, 137: 692-693.
341. Sánchez F, Touriño A, Traseira S, Pérez-Aranda A, Rubio V & Peñaflor MA, 1986. Molecular cloning and characterization of the *trpC* gene from *Penicillium chrysogenum*. *Mol Gen Genet*, 205:248-252.
342. Sánchez F, Losano M, Rubio V & Peñaflor MA, 1987. Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, 51:97-102.
343. Sanders CC, 1987. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol*, 41:573-593.
344. Sanger F, Nicken S & Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463-5467.
345. Sanger F, Coulson AR, Barrell BG, Smith JH & Roe BA, 1980. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol*, 143:161-178.
346. Santangelo GM, Tornow J, McLaughlin CS & Moldava K, 1988. Properties of promoters randomly cloned from the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol Cell Biol*, 8:4217-4224.
347. Samson D, Movva NR, Smith TF, El Alami M & Davies J, 1987. Plasmid-determined bleomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 17:46-53.
348. Serluppi-Crescenzi O, Kurtz MB & Champe SP, 1983. Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, 129:3535-3544.
349. Shen Y-Q, Wolfe S & Demain AL, 1986. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Biotechnology*, 4:61-64.
350. Shewale JG & Sivaraman B, 1989. Penicillin acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. *Process Biochem*, 24:146-154.
351. Shiffman D, Mevarech M, Jensen SE, Cohen G & Aharonowitz Y, 1986. Cloning and comparative sequences analysis of the gene coding for isopenicillin N synthase in *Streptomyces*. *Mol Gen Genet*, 214:562-569.
352. Shiffman D, Cohen G, Aharonowitz Y, Palissa H, von Dohren H, Kainkauf H & Mevarech M, 1990. Nucleotide sequence of the isopenicillin N synthase gene (*pcbC*) of the gram negative *Flavobacterium* sp. SC 12,154. *Nucleic Acid Res*, 18:660.
353. Shuster JR, Moyer D & Irvine B, 1987. Sequence of the *Kluyveromyces lactis* URA3 gene. *Nucleic Acid Res*, 15:8373.
354. Simon JR & Moore PD, 1987. Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7:2329-2334.
355. Skatrud PL & Queener SW, 1984. Cloning of a DNA fragment from *Cephalosporium acremonium* which functions as an autonomous replication sequence in yeast. *Curr Genet*, 8:155-164.
356. Skatrud PL, Fisher DL, Ingolia TD & Queener SW, 1986 (publ. en 1987). Improved transformation of *Cephalosporium acremonium*. In: Alacevic M, Rranueli D & Toman Z (eds.). *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. PLIVA, Zagreb, Yugoslavia. Vol. B, pp. 111-119.
357. Skatrud PL, Queener SW, Carr LG & Fisher DL, 1987. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 12:337-348.
358. Skatrud PL & Queener SW, 1989. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene*, 78:331-338.
359. Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL & Queener SW, 1989. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnology*, 7:477-485.
360. Skatrud PL, 1992. Genetic engineering of β -lactam antibiotic biosynthesis pathways in filamentous fungi. *Trends Biotechnol*, 10:324-329.
361. Smit R & Tudzinsky P, 1992. Efficient transformation of *Claviceps purpurea* using pyrimidine auxotrophic mutants: cloning of the OMP decarboxylase gene. *Mol Gen Genet*, 234:297-305.
362. Smith AW, Ramsden M, Dobson MJ, Hardford & Peberdy JF, 1990. Regulation of isopenicillin N synthetase (IPNS) gene expression in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology*, 8:237-240.
363. Smith AW, Collis K, Ramsden M, Fox HM & Peberdy JF, 1991. Chromosome rearrangements in improved cephalosporin C-producing strains of *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet*, 19:235-237.
364. Smith AW, Ramsden M & Peberdy JF, 1992. Analysis of promoter activity by transformation of *Acremonium chrysogenum*. *Gene*, 114:211-216.
365. Smith DJ, Bull JH, Edwards J & Turner G, 1989. Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol Gen Genet*, 216:492-497.
366. Smith DJ, Earl A & Turner G, 1990. The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421 073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *EMBO J*, 9:2743-2750.
367. Smith JL, Bayliss FT & Ward M, 1991. Sequence of the cloned *pyr4* gene of *Trichoderma reesei* and its use as a homologous selectable marker for transformation. *Curr Genet*, 19:27-33.
368. Smith M, Leung DW, Gillam S, Astell CR, Montgomery DL & Hall BD, 1979. Sequence of the gene for iso-1 cytochrome C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 16:753-761.
369. Southern EM, 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98:507-517.
370. Specht CA, Muñoz-Rivas A, Novotny CP & Ullrich RC, 1988. Transformation of *Schizophyllum commune*: an analysis of parameters for improving transformation frequencies. *Exp Mycol*, 12:357-366.
371. Struhl K, Cameron JR & Davis RW, 1976. Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:1471-1475.
372. Struhl K, 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Ann Rev Biochem*, 58:1051-1077.
373. Suchi M, 1988. Molecular genetic studies on hereditary orotic aciduria. I. Purification of human orotidine 5'-monophosphate decarboxylase and cloning of its cDNA. *Nagoya Med J*, 32:207-220.
374. Suttle DP, Bugg BY, Winkler JK & Kanalas JJ, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:1754-1758.

BIBLIOGRAFIA

375. Tartoff KB & Hobbs CA, 1988. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Focus*, 9:12.
376. Takita T, Murakoa Y, Nakatani T, Fujii A, Umezawa Y, Naganawa H & Umezawa H, 1978. Chemistry of bleomycin. XIX. Revised structures of bleomycin and phleomycin. *J Antibiot*, 31:801-804.
377. Theisen M, Kelln RA & Neuhaard J, 1987. Cloning and characterization of the *pyrF* operon of *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem*, 164:613-619.
378. Theisen M & Neuhaard, 1990. Translational coupling in the *pyrF* operon of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet*, 222:345-352.
379. Thomas BJ & Rothstein R, 1989. Elevated transcription rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56:619-630.
380. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zisman JH, Lockington RA & Davies RW, 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26:205-221.
381. Timberlake WE (ed.), 1985. *Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Alan R. Liss, Nueva York.
382. Timberlake WE & Marshall MA, 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. *Science*, 244:1313-1317.
383. Tipper DJ, 1986. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *En: Queener SF et al. (eds.), op. cit. [314]. Cap. 2, pp. 17-48.*
384. Tobin MB, Fleming MD, Skatrud PL & Ingolia TD, 1990. Molecular characterization of the acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172:5908-5914.
385. Tobin MB, Kovacevik S, Madduri K, Hawkins JA, Skatrud PL, Vining LC, Stutterd C & Miller JR, 1991. Localization of the lysine ϵ -aminotransferase (*lat*) and δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (*pchAB*) genes from *Streptomyces clavuligerus* and production of lysine ϵ -aminotransferase activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173:6223-6229.
386. Traut TW, 1982. UMP synthase: the importance of quaternary structure in channeling intermediates. *Trends Biochem Sci*, 7:255-257.
387. Tudzynski P & Esser K, 1982. Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium*. II: Development of a mitochondrial DNA hybrid vector replicating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 6:153-158.
388. Turgeon BG, Garbar RC & Yoder OC, 1987. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Mol Cell Biol*, 7:3297-3305.
389. Turnbough CL, Kerr KH, Funderburg WR, Donahue JP & Powell PE, 1987. Nucleotide sequence and characterization of the *pyrF* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*, 262:10239-10245.
390. Ueda K, Hiasa H, Takebe S, Sakai H & Komano T, 1992. Alternative secondary structures in the phage G4 origin of the complementary DNA strand synthesis: effects of NaCl concentration on the bleomycin-DNA interaction. *Biosci Biotech Biochem*, 56:394-398.
391. Upshall A, 1986. Filamentous fungi in biotechnology. *BioTechniques*, 4:158-166.
392. Upshall A, Gilbert T, Seari G, O'Hara PJ, Weglanski P, Berse B, Miller K & Timberlake WE, 1986. Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 204:349-354.
393. Upshall A, Kumar AA, Kauschansk K & McKnight GL, 1991. Molecular manipulation of and heterologous protein secretion from filamentous fungi. *En: Leong SA & Berka RM (eds.), op. cit. [232]. Cap. 2, pp. 31-44.*
394. Valle F, Balbás P, Marino E & Bolívar F, 1991. The role of penicillin amidases in nature and industry. *Trends Biochem Sci*, 16:36-40. [Corrigendum: *ibid.*, pag. 194].
395. van Engelenburgh F, Sait R, Goosen T, van der Broek H & Tudzynski P, 1989. Transformation of *Claviceps purpurea* using a bleomycin resistance gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 30:364-370.
396. van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CMJ, Pouwels PH & van den Hondel CAMJJ, 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol Gen Genet*, 206:71-75.
397. van Heeswick R & Roncero MIG, 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res Commun*, 49:691-702.
398. Veenstra AE, van Solingen P, Bovenberg RAL & van der Voort LHM, 1991. Strain improvement of *Penicillium chrysogenum* by recombinant DNA techniques. *J Biotechnol*, 17:81-90.
399. Vian A & Peñalva MA, 1989. Nucleotide sequence of the *Cephalosporium acremonium pyr-4* gene. *Nucleic Acid Res*, 17:8874.
400. Vian A & Peñalva MA, 1990. Cloning of the *pyr-4* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 17:223-227.
401. Vieira J & Messing J, 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19:259-268.
402. Villanueva JR, 1966. Protoplasts of fungi. *En: Ainsworth GC & Sussman AS (eds.), The Fungi - An Advanced Treatise. Vol II: The Fungal Organism. Academic Press, Nueva York. Cap. 1, pp. 3-62.*
403. Vining LC, 1987. Biotechnology and antibiotics. *Dev Ind Microbiol*, 27:1-10.
404. Vollmer SJ & Yanofsky C, 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:4869-4873.
405. Walts M & Rick U, 1991. Polymorphic karyotypes in related *Acremonium* strains. *Curr Genet*, 19:73-76.
406. Ward M & Turner G, 1986. The ATP synthase subunit 9 gene of *Aspergillus nidulans*: sequence and transcription. *Mol Gen Genet*, 205:331-338.
407. Ward M, Wilkinson B & Turner G, 1986. Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned oligomycin-resistant ATP synthase unit sub-unit 9 gene. *Mol Gen Genet*, 202:265-270.
408. Ward M, Kodama KH & Wilson LJ, 1989. Transformation of *Aspergillus awamori* and *A. niger* by electroporation. *Exp Mycol*, 13:289-293.
409. Weigel BJ, Burgett SG, Chen VJ, Skatrud PL, Frolik CA, Queener SW & Ingolia TD, 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*, 170:3817-3826.
410. Wernars K, Goosen T, Wennekes BMJ, Swart K, van den Hondel CAMJJ & van der Broek H, 1987. Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: A tool for replacing fungal genes. *Mol Gen Genet*, 209:71-77.
411. Whale E & Keller W, 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem*, 61:419-440.
412. Whitehead NP, Gurr SJ, Grieve C, Unkles SE, Spence D, Ramsden M & Kinghorn JR, 1990. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niaD*). *Gene*, 90:193-198.
413. Wilson LJ, Carona C & Ward M, 1988. Sequence of the

BIBLIOGRAFIA

Aspergillus niger pyrG gene. Nucleic Acid Res, 16:2339.

414. Wolfe S, Demain AL, Jensen SE & Westlake DWS, 1984. Enzymatic approach to syntheses of unnatural beta-lactams. Science, 226:1386-1392.

415. Woloshuk CP, Seip ER, Payne GA & Adkins CR, 1989. Genetic transformation system for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol, 55:86-90.

416. Wu R, Grossmann L & Moldave K (eds.), 1983. Recombinant DNA. Part C. (Methods in Enzymology, Vol. 101). Academic Press, Nueva York. Sec. II: Cloning of genes into yeast, pp. 197-343.

417. Yanish-Parron C, Vieira J & Messing J, 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33:103-119.

418. Yelton MM, Haer JE, De Souza ER, Mullaney EJ & Timberlake WE, 1983. Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans* trpC gene. Proc Natl Acad Sci USA, 80:7576-7580.

419. Yelton MM, Timberlake WE & van den Hondel CAMJJ, 1985. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated yA locus. Proc Natl Acad Sci USA, 82:834-838.

420. Yuan G-F, Fu Y-H & Marzluf JW, 1991. nit-4, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. Mol Cell Biol, 11:5735-5745.